

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 547**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04776252 .1**
96 Fecha de presentación: **01.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1636268**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54 Título: **Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide**

30 Prioridad:
30.05.2003 US 474654 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.06.2012

73 Titular/es:
**Janssen Alzheimer Immunotherapy
2nd Floor, Treasury Building Lower Grand Canal
Street
Dublin 2, IE y
Wyeth LLC**

72 Inventor/es:
**BASI, Guriq;
SALDANHA, Jose, W. y
BARD, Frédérique**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 382 547 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide

Campo de la invención

5 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que da como resultado demencia senil. Véase en general Selkoe, TINS 16:403 (1993); Hardy y col., documento WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438 (1994); Duff y col, Nature 373:476 (1995); Games y col, Nature 373:523 (1995). En términos generales, la enfermedad queda en dos categorías: aparición tardía, que se produce a edad avanzada (+ de 65 años) y aparición temprana, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre los 35 y 60 años. En ambos tipos de enfermedades, la patología es la misma pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en casos que comienzan a una edad más temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, ovillos neurofibrilares y placas seniles. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau asociada a microtúbulos que consisten en dos filamentos enrollados entre sí en pares. Las placas seniles (es decir, placas amiloides) son áreas de neuropilos desorganizados hasta 150 μm transversalmente con depósitos amiloides extracelulares en el centro que son visibles por análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. La acumulación de placas amiloides dentro del cerebro también está asociada con síndrome de Down y otros trastornos cognitivos.

El principal constituyente de las placas es un péptido denominado péptido A β o β -amiloide. El péptido A β es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de una glucoproteína transmembrana más grande llamada proteína precursora amiloide (APP). Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas secretasa, A β se encuentra principalmente tanto en una forma corta, 40 aminoácidos de longitud, como en una forma larga, que varía de 42 a 43 aminoácidos de longitud. Parte del dominio transmembrana hidrófobo de APP se encuentra en el extremo carboxilo de A β , y puede explicar la capacidad de A β para agregarse en placas, particularmente en el caso de la forma larga. La acumulación de placas amiloides en el cerebro conduce con el tiempo a muerte de las células neuronales. Los síntomas físicos asociados con este tipo de deterioro neural caracterizan la enfermedad de Alzheimer.

Se han correlacionado varias mutaciones dentro de la proteína APP con la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Véase, por ejemplo, Goate y col, Nature 349:704 (1991) (valina⁷¹⁷ a isoleucina); Chartier Harlan y col, Nature 353:844 (1991) (valina⁷¹⁷ a glicina); Murrell y col, Science 254:97 (1991) (valina⁷¹⁷ a fenilalanina); Mullan y col, Nature Genet. 1:345 (1992) (una doble mutación que cambia lisina⁵⁹⁵ - metionina⁵⁹⁶ a asparagina⁵⁹⁵ -leucina⁵⁹⁶). Se cree que tales mutaciones provocan la enfermedad de Alzheimer por procesamiento aumentado o alterado de APP a A β , particularmente procesamiento de APP a cantidades aumentadas de la forma larga de A β (es decir, A β 1-42 y A β 1-43). Se cree que las mutaciones en otros genes, tales como los genes de presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente al procesamiento de APP para generar cantidades aumentadas de la forma larga de A β (véase Hardy, TINS 20:154 (1997)).

35 Se han usado con éxito modelos de ratón para determinar la importancia de las placas amiloides en Alzheimer (Games y col, mencionado anteriormente, Jonson-Wood y col, Proc. Natl. Acad Sci. USA 94:1550 (1997)). En particular, cuando se inyecta a ratones transgénicos PDAPP (que expresan una forma mutante de APP humana y desarrollan enfermedad de Alzheimer a una edad joven) la forma larga de A β , estos presentan tanto una reducción de la progresión de Alzheimer como un aumento de las titulaciones de anticuerpo para el péptido A β (Schenk y col, Nature 400, 173 (1999)). Las observaciones analizadas anteriormente indican que A β , particularmente en su forma larga, es un elemento causante de la enfermedad de Alzheimer.

En consecuencia, existe la necesidad de nuevas terapias y reactivos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en particular, terapias y reactivos capaces de efectuar un beneficio terapéutico a dosis fisiológicas (por ejemplo, no tóxicas).

45 El documento WO-A-02/088306 desvela formas humanizadas del anticuerpo de ratón 3D6 que conservan las propiedades de unión de 3D6 de ratón, y el uso de estos anticuerpos en el tratamiento del síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer y angiopatía amiloide cerebral.

El documento EP-A-0921189 desvela animales transgénicos, especialmente ratones, que expresan de forma constitutiva una molécula de tipo anticuerpo codificada por el transgén y que tiene una región constante de cadena pesada de IgE y es específica para un antígeno predefinido.

El documento WO-A-95/07301 desvela anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados IL4 derivados de anticuerpos monoclonales de alta afinidad, y el uso de estos anticuerpos en procedimientos de tratamiento.

Sumario de la invención

55 La presente invención presenta nuevos reactivos inmunológicos, en particular, reactivos de anticuerpos terapéuticos para la prevención y el tratamiento de enfermedad amiloidogénica (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). La

invención se basa en la identificación y caracterización de un anticuerpo monoclonal, 12A11, que se une específicamente a péptido A β y es eficaz en la reducción de la carga de placas asociada con trastornos amiloidogénicos. El análisis estructural y funcional de este anticuerpo conduce al diseño de anticuerpos 12A11 humanizados para uso profiláctico y/o terapéutico. En particular, la invención presenta humanización de las regiones variables de este anticuerpo y, en consecuencia, posibilita las cadenas de anticuerpo o inmunoglobulina 12A11 humanizadas, inmunoglobulinas 12A11 humanizadas intactas o anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo o inmunoglobulina 12A11 funcionales, en particular, fragmentos de unión a antígeno, del anticuerpo 12A11.

También se desvelan polipéptidos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal 12A11, así como reactivos polinucleotídicos, vectores y células huésped adecuadas para codificar dichos polipéptidos.

Se desvelan procedimientos para tratar enfermedades o trastornos amiloidogénicos (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), así como composiciones farmacéuticas y kits para su uso en tales aplicaciones.

También se presentan procedimientos para identificar restos dentro del 12A11 presentado que son importantes para la función inmunológica apropiada y para identificar restos que sean susceptibles de sustitución en el diseño de anticuerpos humanizados que tengan afinidades de unión mejoradas y/o inmunogenicidad reducida, cuando se usan como reactivos terapéuticos.

También se presentan anticuerpos 12A11 (por ejemplo, anticuerpos humanizados) que tienen funciones efectoras alteradas y usos terapéuticos de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La *Figura 1* representa gráficamente los resultados de un experimento que examina la eficacia de diversos anticuerpos, incluyendo 12A11, en la eliminación de placas A β en un ensayo de fagocitosis *ex vivo*.

La *Figura 2A* representa gráficamente los resultados de un experimento que examina la eficacia de diversos anticuerpos, incluyendo 12A11, en la reducción de niveles de A β totales. Las barras representan los valores de la mediana, y la línea horizontal discontinua indica el nivel de control. La *Figura 2B* representa gráficamente resultados de un experimento que analiza la eficacia de diversos anticuerpos, incluyendo 12A11, en la reducción de la distrofia neurítica. Las barras representan valores de la mediana y la línea horizontal discontinua indica el nivel de control. Se muestran datos para animales individuales y se expresan como el porcentaje de distrofia neurítica en relación con la media del control (establecida al 100 %).

La *Figura 3A* representa una secuencia de ADN que incluye la secuencia de cadena VL de 12A11 murino y la secuencia de aminoácidos deducida para la cadena VL (SEC ID N°: 5 y 2, respectivamente). La cadena VL madura se indica por una barra negra sólida. Las CDR se indican por barras abiertas. La *Figura 3B* representa una secuencia de ADN que incluyen la secuencia de cadena VH de 12A11 murino y la secuencia de aminoácidos deducida para la cadena VH (SEC ID N°: 6 y 3, respectivamente). La cadena VH madura se indica por una barra negra sólida. Las CDR se indican por barras abiertas. Las secuencias de ADN incluyen sitios de clonación y secuencias Kozak (cadena arriba de secuencias codificantes) y secuencias de corte y empalme y clonación (cadena abajo).

La *Figura 4* representa gráficamente los resultados de ELISA de un experimento que mide la unión de 12A11 quimérico, 3D6 quimérico y humanizado, y 12B4 quimérico y humanizado para A β 1-42.

La *Figura 5A* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpos 12A11 murino (o quimérico) (SEC ID N°: 2), 12A11 humanizado (péptido maduro, SEC ID N°: 7), GenBank BAC01733 (SEC ID N°: 8) y A19 de línea germinal (X63397, SEC ID N° 9). Las regiones CDR se representan en cajas. Los restos de empaquetamiento están subrayados. Numeración desde la primera metionina, no numeración de Kabat. La *Figura 5B* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpos 12A11 murino (o quimérico) (SEC ID N°: 4), 12A11 humanizado (versión 1) (péptido maduro, SEC ID N°: 10), GenBank AAA69734 (SEC ID N°: 11) y GenBank 567123 de línea germinal (SEC ID N°: 12). Los restos de empaquetamiento están subrayados, los restos canónicos están en relleno sólido y los restos de Vernier están en relleno punteado. Numeración desde la primera metionina, no numeración de Kabat.

Las *Figuras 6A-B* representan un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de 12A11 v1 (SEC ID N°: 10), v2 (SEC ID N°: 13), v2.1 (SEC ID N°: 14), v3 (SEC ID N°: 15), v4.1 (SEC ID N°: 16), v4.2 (SEC ID N°: 17), v4.3 (SEC ID N°: 18), v4.4 (SEC ID N°: 19), v5.1 (SEC ID N°: 20), v5.2 (SEC ID N°: 21), v5.3 (SEC ID N°: 22), v5.4 (SEC ID N°: 23), v5.5 (SEC ID N°: 24), v5.6 (SEC ID N°: 25), v6.1 (SEC ID N°: 26), v6.2 (SEC ID N°: 27), v6.3 (SEC ID N°: 28), v6.4 (SEC ID N°: 29), v7 (SEC ID N°: 30) y v8 (SEC ID N°: 31) humanizados. La *Figura 6C* expone las retromutaciones realizadas en 12A11 humanizado v1 a v8.

La *Figura 7* representa los resultados de un ELISA de A β (1-42) agregado que compara 12A11 quimérico, 12A11 v1 humanizado, 12A11 v2 humanizado, 12A11 v2.1 humanizado y 12A11 v3 humanizado.

La *Figura 8* representa los resultados de un ensayo de unión de ELISA de A β 1-42 competitivo que compara 12A11 murino, 12A11 quimérico y h12A11 v1.

Descripción detallada de la invención

- La presente invención presenta nuevos reactivos y procedimientos inmunológicos para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades amiloidogénicas. La invención se basa en la caracterización de una inmunoglobulina monoclonal, 12A11, eficaz en la unión de proteína beta amiloide (A β) (por ejemplo, unión de A β soluble y/o agregado), mediación de la fagocitosis (por ejemplo, de A β agregado), reducción de la carga de placas y/o reducción de la distrofia neurítica (por ejemplo, en un paciente). La invención se basa adicionalmente en la determinación y caracterización estructural de la estructura primaria y secundaria de las cadenas ligera y pesada variables de la inmunoglobulina 12A11 y la identificación de restos importantes para actividad e inmunogenicidad.
- Se presentan inmunoglobulinas que incluyen una cadena pesada variable y ligera variable de la inmunoglobulina monoclonal 12A11 descrita en el presente documento. Se presentan inmunoglobulinas preferidas, por ejemplo, inmunoglobulinas terapéuticas que incluyen una cadena pesada variable humanizada y ligera variable humanizada. Las cadenas pesada variable y ligera variable preferidas incluyen regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la inmunoglobulina 12A11 (por ejemplo, inmunoglobulina donadora) y regiones flanqueantes variables de o sustancialmente de una inmunoglobulina aceptora humana. La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina aceptora humana" significa que restos flanqueantes clave o la mayoría de ellos son de la secuencia aceptora humana, lo que permite, sin embargo, la sustitución de restos en ciertas posiciones con restos seleccionados para mejorar la actividad de la inmunoglobulina humanizada (por ejemplo, alterar la actividad de modo que se asemeje más cercanamente a la actividad de la inmunoglobulina donadora) o seleccionados para reducir la inmunogenicidad de la inmunoglobulina humanizada.
- En una realización, la invención presenta una inmunoglobulina humanizada que incluye regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable de 12A11 (es decir, incluye tres CDR de la secuencia de región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N $^{\circ}$: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N $^{\circ}$: 4) e incluye una región flanqueante variable de una secuencia de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, que tiene opcionalmente al menos un resto del resto flanqueante retromutado a un resto murino correspondiente, en la que dicha retromutación no afecta sustancialmente a la capacidad de la cadena para dirigir la unión de A β .
- En una realización, la invención presenta una ligera de inmunoglobulina humanizada que incluye regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable de 12A11 (es decir, incluye tres CDR de la secuencia de región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N $^{\circ}$: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N $^{\circ}$: 4) e incluye una región flanqueante variable sustancialmente de una secuencia de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina aceptora humana, opcionalmente que tiene al menos un resto del resto flanqueante retromutado a un resto de murina correspondiente, en la que dicha retromutación no afecta sustancialmente a la capacidad de la cadena para dirigir la unión de A β .
- En otra realización, la invención presenta una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable de 12A11 (por ejemplo, incluye tres CDR de la secuencia de región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N $^{\circ}$: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N $^{\circ}$: 4) e incluye una región flanqueante variable sustancialmente de una secuencia de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, opcionalmente que tiene al menos un resto flanqueante sustituido con el resto aminoacídico correspondiente de la secuencia de región variable de cadena pesada o ligera de 12A11 de ratón, en la que el resto flanqueante se selecciona del grupo que consiste en (a) un resto que se une de forma no covalente al antígeno directamente; (b) un resto adyacente a una CDR; (c) un resto que interacciona con CDR (por ejemplo, identificado por realización de modelo de la cadena ligera o pesada en la estructura resuelta de una cadena de inmunoglobulina conocida homóloga); y (d) un resto que participa en el interfaz VL-VH.
- En otra realización, la invención presenta una inmunoglobulina humanizada que incluye CDR de región variable de 12A11 y regiones flanqueantes variables de una secuencia de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, que tiene opcionalmente al menos un resto flanqueante sustituido con el resto aminoacídico correspondiente de la secuencia de región variable de cadena ligera o pesada de 12A11 de ratón, en la que el resto flanqueante es un resto capaz de afectar a la conformación o función de la región variable de cadena ligera como se identifica por análisis de un modelo tridimensional de la región variable, por ejemplo un resto capaz de interactuar con el antígeno, un resto próximo al sitio de unión a antígeno, un resto capaz de interactuar con una CDR, un resto adyacente a una CDR, un resto a una distancia de 6 Å de un resto de CDR, un resto canónico, un resto de zona de Vernier, un resto de empaquetamiento intercatenario, un resto inusual o un resto de sitio de glucosilación en la superficie de modelo estructural.
- En otra realización, la invención presenta, además de las sustituciones descritas anteriormente, una sustitución de al menos un resto flanqueante humano poco común. Por ejemplo, puede sustituirse un resto poco común con un resto aminoacídico que es común para secuencias de cadena variable humana en esa posición. Como alternativa, puede sustituirse un resto poco común con un resto aminoacídico correspondiente de una secuencia de cadena variable de línea germinal homóloga.

La invención presenta una inmunoglobulina humanizada que incluye una cadena ligera y una cadena pesada, como se ha descrito anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de dicha inmunoglobulina. En una realización a modo de ejemplo, la inmunoglobulina humanizada se une (por ejemplo, se une específicamente) a péptido beta amiloide (A β) con una afinidad de unión de al menos 10^7 M⁻¹, 10^8 M⁻¹ o 10^9 M⁻¹. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno incluye una cadena pesada que tiene isotipo γ 1. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno se une (por ejemplo, se une específicamente) a péptido beta amiloide soluble (A β) o A β agregado o a ambos. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno captura A β soluble (por ejemplo, A β 1-42 soluble). En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno media en la fagocitosis (por ejemplo, induce fagocitosis) de péptido beta amiloide (A β). En otra realización más, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno cruza la barrera hematoencefálica en un sujeto. En otra realización más, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno reduce la carga de péptido beta amiloide (A β) o la distrofia neurítica o ambas en un sujeto.

En otra realización, la invención presenta inmunoglobulinas quiméricas que incluyen regiones variables 12A11 (por ejemplo, las secuencias de región variable expuestas como SEC ID N^o: 2 y SEC ID N^o: 4). En otra realización más, la inmunoglobulina, o fragmento de unión a antígeno de la misma, incluye adicionalmente regiones constantes de IgG1.

Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento son particularmente adecuadas para su uso en procedimientos terapéuticos dirigidos a prevenir o tratar enfermedades amiloidogénicas. En una realización, la divulgación presenta un procedimiento para prevenir o tratar una enfermedad amiloidogénica (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) que implica administrar al paciente una dosificación eficaz de una inmunoglobulina humanizada como se describe en el presente documento. En otra realización, la invención presenta composiciones farmacéuticas que incluyen una inmunoglobulina humanizada como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéutico. También se presentan moléculas de ácido nucleico aisladas, vectores y células huésped para producir las inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina o cadenas descritas en el presente documento, así como procedimientos para producir dichas inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulina o cadenas de inmunoglobulina

La presente divulgación presenta adicionalmente un procedimiento para identificar restos de 12A11 susceptibles de sustitución cuando se produce una inmunoglobulina de 12A11 humanizada, respectivamente. Por ejemplo, un procedimiento para identificar restos de región flanqueante variable susceptibles de sustitución implica realizar un modelo de la estructura tridimensional de una región variable de 12A11 en una estructura de inmunoglobulina homóloga resuelta y analizar dicho modelo con respecto a restos capaces de afectar a la conformación o función de la región variable de inmunoglobulina de 12A11, de modo que se identifiquen restos susceptibles de sustitución. La divulgación presenta adicionalmente uso de la secuencia de región variable expuesta como SEC ID N^o: 2 o SEC ID N^o: 4, o cualquier parte de la misma, en la producción de una imagen tridimensional de una inmunoglobulina 12A11, cadena de inmunoglobulina de 12A11 o dominio de las mismas.

La presente invención presenta adicionalmente inmunoglobulinas que tienen función efectora alterada, tal como la capacidad de unirse a moléculas efectoras, por ejemplo, complemento o un receptor en una célula efectora. En particular, la inmunoglobulina de la invención tiene una región constante alterada, por ejemplo, región Fc, en la que al menos un resto aminoacídico en la región Fc se ha reemplazado con un resto o cadena lateral diferente. En una realización, la inmunoglobulina modificada es de la clase de IgG, comprende al menos un reemplazo de resto aminoacídico en la región Fc de modo que la inmunoglobulina tiene una función efectora alterada, por ejemplo, en comparación con una inmunoglobulina no modificada. En realizaciones particulares, la inmunoglobulina de la invención tiene una función efectora alterada, de modo que sea menos inmunogénica (por ejemplo, no provoque actividad de células efectoras no deseada, lisis o unión de complemento), tiene propiedades de eliminación de amiloide mejorada, y/o tiene una semivida deseable.

Antes de describir la invención, puede ser útil para un entendimiento de la misma exponer definiciones de ciertos términos para su uso en lo sucesivo en el presente documento.

El término "inmunoglobulina" o "anticuerpo" (usados de forma intercambiable en el presente documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de cuatro polipéptidos básica que consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente a antígeno. La expresión "inmunoglobulina de cadena sencilla" o "anticuerpo de cadena sencilla" (usados de forma intercambiable en el presente documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptido que consiste en una cadena pesada y una ligera, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, por engarces peptídicos intercatenarios, que tiene la capacidad para unirse específicamente a antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (por ejemplo, que comprende de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, por lámina plegada en β y/o enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se denominan adicionalmente en el presente documento "constantes" o "variables", basándose en la falta relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de miembros de diversas clases en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de miembros de diversas clases en el caso de un dominio "variable".

Los "dominios" de anticuerpo o polipéptido se denominan con frecuencia de forma intercambiable en la técnica "regiones" de anticuerpo o polipéptido. Los dominios "constantes" de una cadena ligera de anticuerpo se denominan de forma intercambiable "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de una cadena pesada de anticuerpo se denominan de forma intercambiable "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH"). Los dominios "variables" de una cadena ligera de anticuerpo se denominan de forma intercambiable "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL"). Los dominios "variables" de una cadena pesada de anticuerpo se denominan de forma intercambiable "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH").

El término "región" también puede referirse a una parte o porción de una cadena de anticuerpo o dominio de cadena de anticuerpo (por ejemplo, una parte o porción de una cadena pesada o ligera o una parte o porción de un dominio constante o variable, como se define en el presente documento), así como más partes o porciones discretas de dichas cadenas o dominios. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada o dominios variables de cadena ligera y pesada incluyen "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" intercaladas entre "regiones flanqueantes" o "FR", como se define en el presente documento.

Las inmunoglobulinas o los anticuerpos pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos aminoacídicos que un anticuerpo intacto o completo o cadena de anticuerpo. Los fragmentos pueden obtenerse mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también pueden obtenerse por medios recombinantes. Los fragmentos a modo de ejemplo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y/o Fv. La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a antígeno o compite con anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que deriva) para unión a antígeno (es decir, unión específica).

El término "conformación" se refiere a la estructura terciaria de una proteína o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo, cadena de anticuerpo, dominio o región del mismo). Por ejemplo, la frase "conformación de cadena ligera (o pesada)" se refiere a la estructura terciaria de una región variable de cadena ligera (o pesada) y la frase "conformación de anticuerpo" o "conformación de fragmento de anticuerpo" se refiere a la estructura terciaria de un anticuerpo o fragmento del mismo.

"Unión específica" de anticuerpo significa que el anticuerpo muestra afinidad apreciable por un antígeno o epítipo particular y, en general, no muestra reactividad cruzada significativa. En realizaciones a modo de ejemplo, el anticuerpo no muestra reactividad cruzada (por ejemplo, no reacciona de forma cruzada con péptidos no Aβ o con epítopos remotos en Aβ). La unión "apreciable" o preferida incluye unión con una afinidad de al menos 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ M⁻¹ o 10¹⁰ M⁻¹. Se prefieren más afinidades mayores de 10⁷ M⁻¹, preferentemente mayores de 10⁸ M⁻¹. También se pretende que los valores intermedios de los expuestos en el presente documento estén dentro del alcance de la presente invención y una afinidad de unión preferida puede indicarse como un intervalo de afinidades, por ejemplo, 10⁶ a 10¹⁰ M⁻¹, preferentemente 10⁷ a 10¹⁰ M⁻¹, más preferentemente 10⁸ a 10¹⁰ M⁻¹. Un anticuerpo que "no muestra reactividad cruzada significativa" es uno que no se unirá de forma apreciable a una entidad no deseable (por ejemplo, una entidad proteínica no deseable). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a Aβ se unirá de forma apreciable a Aβ pero no reaccionará de forma significativa con proteínas o péptidos no Aβ (por ejemplo, proteínas o péptidos no Aβ incluidos en placas). Un anticuerpo específico para un epítipo particular, por ejemplo, no reaccionará de forma cruzada significativamente con epítopos remotos en la misma proteína o péptido. Puede determinarse unión específica de acuerdo con cualquier medio reconocido en la técnica para determinar dicha unión. Preferentemente, la unión específica se determina de acuerdo con análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

Se producen fragmentos de unión por técnicas de ADN recombinantes o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cadenas sencillas y anticuerpos de cadena sencilla. Además de inmunoglobulinas o anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que una inmunoglobulina o anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena ligera/pesada diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos por una diversidad de procedimientos incluyendo fusión de hibridomas o ligación de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny y col, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

La expresión "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de anticuerpo o inmunoglobulina humanizada (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). La expresión "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizada" (es decir, una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región flanqueante variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad

(CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano, e incluye adicionalmente regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o parte de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferentemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). La expresión "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región flanqueante variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que, cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina o anticuerpo humano para fines de comparación, la región comparte al menos el 80-90 %, 90-95 % o 95-99 % de identidad (es decir, identidad de secuencia local) con la secuencia de región flanqueante o constante humana, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones y similares. La introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones y similares, se denomina con frecuencia "optimización" de una cadena o anticuerpo humanizado. La frase "sustancialmente de un anticuerpo o inmunoglobulina no humana" o "sustancialmente no humana" significa que tiene una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo al menos el 80-95 %, preferentemente al menos el 90-95 %, más preferentemente, el 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la de un organismo no humano, por ejemplo, un mamífero no humano.

En consecuencia, todas las regiones o restos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las regiones correspondientes o restos de una o más secuencias de inmunoglobulina humanas nativas. La expresión "región correspondiente" o "resto correspondiente" se refiere a una región o resto en una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos que ocupa la misma (es decir, equivalente) posición que una región o resto en una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos, cuando la primera y segunda secuencia están alineadas de forma óptima para fines de comparación.

La expresión "identidad significativa" significa que dos secuencias polipeptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 50-60 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 60-70 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 70-80 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 80-90 % de identidad, aun más preferentemente al menos el 90-95 % de identidad, y aun más preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencia o más (por ejemplo, el 99 % de identidad de secuencia o más). La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias polipeptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 80-90 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 90-95 % de identidad de secuencia y más preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencia o más (por ejemplo, el 99 % de identidad de secuencia o más). Para la comparación de secuencia, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros de programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designado.

Puede realizarse un alineamiento óptimo de secuencias para comparación, por ejemplo, por medio del algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol Biol. 48:443 (1970), por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA. 85:2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT FASTA y TFASTA en el paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual (véase, en general, Ausubel y col, Current Protocols in Molecular Biology). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col, J. Mol Biol. 215:403 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (al que se puede acceder públicamente a través del servidor de internet de NCBI de los Institutos Nacionales de Salud). Normalmente, pueden usarse parámetros de programa por defecto para realizar la comparación de secuencia, aunque también pueden usarse parámetros adaptados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabras (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Para fines de clasificar sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, leu, val, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (restos que influyen en la orientación de cadena): gly., pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre

aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen intercambiar con un miembro de una de estas clases un miembro de otra.

Preferentemente, las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados se unen a antígeno con una afinidad que está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco del anticuerpo no humanizado correspondiente. Por ejemplo, si el anticuerpo no humanizado tiene una afinidad de unión de 10^9 M^{-1} , los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de al menos $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Cuando se describen las propiedades de unión de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo, la cadena puede describirse basándose en su capacidad para “dirigir la unión a antígeno (por ejemplo, A β)”. Se dice que una cadena “dirige la unión a antígeno” cuando confiere a una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) una propiedad de unión o afinidad de unión específica. Se dice que una mutación (por ejemplo, una retromutación) afecta sustancialmente a la capacidad de una cadena pesada o ligera para dirigir la unión a antígeno si afecta (por ejemplo, reduce) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena en al menos un orden de magnitud en comparación con la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente sin dicha mutación. Una mutación “no afecta sustancialmente (por ejemplo, reduce) la capacidad de una cadena para dirigir la unión a antígeno” si afecta a (por ejemplo, reduce) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena en un factor de solamente dos, tres o cuatro de la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente sin dicha mutación.

La expresión “inmunoglobulina quimérica” o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes derivan de una segunda especie. Pueden construirse inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, por ejemplo por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Las expresiones “inmunoglobulina humanizada” o “anticuerpo humanizado” no pretenden abarcar inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define posteriormente. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (es decir, comprende regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden restos de CDR donadores y restos flanqueantes aceptores) no hallados en inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el presente documento.

Un “antígeno” es una entidad (por ejemplo, una entidad proteínica o péptido) a la que se une específicamente un anticuerpo.

El término “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo). Pueden formarse epítipos tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan normalmente en exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Pueden identificarse anticuerpos que reconocen el mismo epítipo en un inmunoensayo sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo con un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina que se ensaya inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común, tal como A β . Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo indirecto o directo de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto de fase sólida, ensayo de competición de tipo sándwich (véase Stahl y col, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (véase Kirkland y col, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo de fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo de fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcaje directo de fase sólida usando marcador I-125 (véase Morel y col., *Mol Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (Cheung y col, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA marcado directo. (Moldenhauer y col, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Normalmente, un ensayo de tal implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan uno de estos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Habitualmente la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Habitualmente, cuando un anticuerpo de competición está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos el 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % o más.

Un epítipo también es reconocido por células inmunológicas, por ejemplo, linfocitos B y/o linfocitos T. El reconocimiento celular de un epítipo puede determinarse por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se determina por incorporación de ^3H -timidina, por secreción de citocinas, por secreción de anticuerpos o por muerte dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos).

Pueden encontrarse epítomos a modo de ejemplo o determinantes antigénicos dentro de la proteína precursora amiloide humana (APP), pero se encuentran preferentemente dentro del péptido A β de APP. Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. A los aminoácidos dentro de APP se les asignan números de acuerdo con la secuencia de la isoforma APP⁷⁷⁰ (véase, por ejemplo, N° de acceso de GenBank P05067). El péptido A β (también denominado en el presente documento péptido beta amiloide y A-beta) es un fragmento interno de aproximadamente 4 kDa de 39-43 aminoácidos de APP (A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43). A β 40, por ejemplo, consiste en los restos 672-711 de APP y A β 42 consiste en los restos 673-713 de APP. Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas secretasa *in vivo* o *in situ*, se encuentra A β tanto en una "forma corta", de 40 aminoácidos de longitud, como en una "forma larga", que varía de 42 a 43 aminoácidos de longitud. Se localizan epítomos o determinantes antigénicos preferidos, como se describe en el presente documento, dentro del extremo N-terminal del péptido A β e incluyen restos dentro de los aminoácidos 1-10 de A β , preferentemente de los restos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 3-7 de A β 42. Los epítomos o determinantes antigénicos referidos adicionales incluyen restos 2-4, 5, 6, 7 u 8 de A β , 3-5, 6, 7, 8 o 9 de A β , o restos 4-7, 8, 9 o 10 de A42. Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítopo dentro de restos específicos, tales como A β 3-7, lo que se entiende es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los restos específicos (es decir, A β 3-7 en este ejemplo). Un anticuerpo tal no entra en contacto necesariamente con cada resto dentro de A β 3-7. Tampoco afecta necesariamente de forma significativa cada sustitución o deleción de aminoácido sencillo en A β 3-7 a la afinidad de unión.

La expresión "enfermedad amiloidogénica" incluye cualquier enfermedad asociada con (o provocada por) la formación o deposición de fibrillas amiloides insolubles. Ejemplos de enfermedades amiloidogénicas incluyen, pero sin limitación, amiloidosis sistémica, enfermedad de Alzheimer, diabetes de aparición madura, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia fronto-temporal y las encefalopatías espongiiformes transmisibles relacionadas con priones (kuru y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos y tembladera y BSE en ovejas y vacas, respectivamente). Diferentes enfermedades amiloidogénicas se definen o caracterizan por la naturaleza del componente polipeptídico de las fibrillas depositadas. Por ejemplo, en sujetos o pacientes que tengan enfermedad de Alzheimer, la proteína β -amiloide (por ejemplo, proteína amiloide β de tipo silvestre, variante o truncada) es el componente polipeptídico característico del depósito amiloide. En consecuencia, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una "enfermedad caracterizada por depósitos de A β " o una "enfermedad asociada con depósitos de A β ", por ejemplo, en el cerebro de un sujeto o paciente. Las expresiones "proteína β amiloide", "péptido β amiloide", " β amiloide", "A β " y "péptido A β " se usan de forma intercambiable en el presente documento.

Un "agente inmunogénico" o "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmune contra sí mismo tras la administración a un mamífero, opcionalmente, junto con un adyuvante.

El término "tratamiento" como se usa en el presente documento, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, favorecer o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

La expresión "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para conseguir o conseguir al menos parcialmente el efecto deseado. La expresión "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y el estado general del sistema inmune del paciente.

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

A β "soluble" o "disociado" se refiere a polipéptido A β disgregado o no agregado, que incluye polipéptido A β soluble monomérico así como soluble oligomérico (por ejemplo, dímeros, trímeros de A β soluble y similares). A β "insoluble" se refiere a polipéptido A β agregado, por ejemplo, A β que se mantiene junto por enlaces no covalentes. Se cree que A β (por ejemplo, A β 42) se agrega, al menos en parte, debido a la presencia de restos hidrófobos en el extremo C terminal del péptido (parte del dominio transmembrana de APP). Puede encontrarse A β soluble *in vivo* en fluidos biológicos tales como fluido cerebroespinal y/o suero. Como alternativa, puede prepararse A β soluble disolviendo péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante se centrifuga (por ejemplo, a 14.000 x g, 4 °C, 10 minutos) para retirar cualquier partícula in soluble.

La expresión "función efectora" se refiere a una actividad que reside en la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) e incluye, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo para unirse a moléculas efectoras tales como receptores de complemento y/o Fc, que pueden controlar varias funciones inmunes del anticuerpo tales como actividad de células efectoras, lisis, actividad mediada por complemento, eliminación de anticuerpos y semivida de anticuerpos.

La expresión "molécula efectora" se refiere a una molécula que es capaz de unirse a la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyendo, pero sin limitación, una proteína del complemento o un receptor de Fc.

La expresión "célula efectora" se refiere a una célula capaz de unirse a la parte Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) normalmente mediante un receptor de Fc expresado en la superficie de la célula efectora que incluye, pero sin limitación, linfocitos, por ejemplo, células presentadoras de antígenos y linfocitos T.

5 La expresión "región Fc" se refiere a una región C-terminal de un anticuerpo IgG, en particular, la región C-terminal de la cadena o cadenas pesadas de dicho anticuerpo IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, se define normalmente que una región Fc abarca aproximadamente del resto aminoacídico Cys226 al extremo carboxilo terminal de una cadena o cadenas pesadas de IgG.

10 La expresión "numeración de Kabat" a no ser que se indique de otro modo se define como la numeración de los restos en, por ejemplo, un anticuerpo de cadena pesada IgG usando el índice de EU como en Kabat y col. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

15 La expresión "receptor de Fc" o "FcR" se refiere a un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Los receptores de Fc típicos que se unen a una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyen, pero sin limitación, receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Se revisan receptores de Fc en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995).

I. Reactivos inmunológicos y terapéuticos

20 Los reactivos inmunológicos y terapéuticos de la invención comprenden o consisten en inmunógenos o anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno o funcionales, como se define en el presente documento. Se sabe que la unidad estructural de anticuerpo básica comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables de reconocimiento de antígenos. La parte carboxilo terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

30 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda y son de aproximadamente 230 restos de longitud. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) o épsilon (ε), son de aproximadamente 450-600 restos de longitud y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se pliegan en dominios. El término "dominio" se refiere a una región globular de una proteína, por ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo. Los dominios de inmunoglobulina o anticuerpo incluyen, por ejemplo, tres o cuatro bucles peptídicos estabilizados por lámina plegada en β y un enlace disulfuro intercatenario. Las cadenas ligeras intactas tienen, por ejemplo, dos dominios (V_L y C_L) y las cadenas pesadas intactas tienen, por ejemplo, cuatro o cinco dominios (V_H, C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}).

35 Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más (véase en general, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989), C. 7).

40 Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión a anticuerpo. Por tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son el mismo. Las cadenas también muestran lo mismo: estructura general de regiones flanqueantes relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las cadenas de origen natural o cadenas producidas de forma recombinante pueden expresarse con una secuencia líder que se retira durante el procesamiento celular para producir una cadena madura. También pueden producirse de forma recombinante cadenas maduras que tienen una secuencia líder de origen no natural, por ejemplo, para potenciar la secreción o alterar el procesamiento de una cadena particular de interés.

45 Las CDR de las dos cadenas maduras de cada par se alinean por las regiones flanqueantes, lo que permite la unión con un epítipo específico. Del extremo N-terminal al C-terminal, las cadenas tanto ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. "FR4" también se denomina en la técnica región D/J de la cadena pesada variable y la región J de la cadena ligera variable. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991). Se ha propuesto una definición estructural alternativa por Chothia y col., J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); y J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (denominado en lo sucesivo en el presente documento de forma colectiva "Chothia y col.").

55

A. Anticuerpos de A β

Los agentes terapéuticos de la invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente a A β u otros componentes de la placa amiloide. Los anticuerpos preferidos son anticuerpos monoclonales. Algunos de tales anticuerpos se unen específicamente a la forma agregada de A β sin unirse a la forma soluble. Algunos se unen específicamente a la forma soluble sin unirse a la forma agregada. Algunos se unen a las formas tanto agregadas como solubles. Los anticuerpos usados en procedimientos terapéuticos preferentemente tienen una región constante intacta o al menos suficiente de la región constante para interactuar con un receptor de Fc. Los anticuerpos preferidos son los eficaces en la estimulación de fagocitosis mediada por Fc de A β en placas. Se prefiere el isotipo humano de IgG1 debido a que tiene la mayor afinidad de isotipos humanos por el receptor FcRI en células fagocíticas (por ejemplo, en macrófagos residentes en el cerebro o células microgliales). IgG1 humana es el equivalente de IgG2a murina, siendo esta última por lo tanto adecuada para ensayar la eficacia *in vivo* en modelos animales (de ratón) de Alzheimer. También pueden usarse fragmentos Fab biespecíficos, en los que una rama del anticuerpo tiene especificidad por A β y la otra por un receptor de Fc. Los anticuerpos preferidos se unen a A β con una afinidad de unión mayor de (o igual a) aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹ (incluyendo afinidades intermedias de estos valores).

Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo específico dentro de A β que puede ser un epítipo conformacional o no conformacional. La eficacia profiláctica y terapéutica de los anticuerpos puede ensayarse usando los procedimientos para modelos animales transgénicos descritos en los ejemplos. Los anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo dentro de los restos 1-10 de A β (con el primer resto N-terminal de A β natural designado 1), más preferentemente con un epítipo dentro de los restos 3-7 de A β . En algunos procedimientos, se usan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión con diferentes epítopos, por ejemplo, un anticuerpo específico para un epítipo dentro de los restos 3-7 de A β puede co-administrarse con un anticuerpo específico para un epítipo fuera de los restos 3-7 de A β . Tales anticuerpos pueden administrarse de forma secuencial o de forma simultánea. También pueden usarse anticuerpos para componentes amiloides distintos de A β (por ejemplo, administrados o co-administrados).

Puede determinarse la especificidad epitópica de un anticuerpo, por ejemplo, formando una biblioteca de presentación de fagos en la que diferentes miembros presentan diferentes subsecuencias de A β . La biblioteca de presentación de fagos se selecciona después con respecto a miembros que se unen específicamente a un anticuerpo del ensayo. Se aísla una familia de secuencias. Normalmente, una familia tal contiene una secuencia central común y diversas longitudes de secuencias flanqueantes en diferentes miembros. La secuencia central más corta que muestra unión específica con el anticuerpo define el epítipo unido con el anticuerpo. Los anticuerpos también pueden ensayarse con respecto a especificidad de epítopos en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad de epítipo ya se ha determinado. Por ejemplo, los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 12A11 por unión con A β se unen al mismo epítipo o uno similar que 12A11, es decir, dentro de los restos A β 3-7. La exploración de anticuerpos con respecto a especificidad de epítopos es una forma de predicción útil de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha determinado que se une a un epítipo dentro de los restos 1-7 de A β es probablemente eficaz en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con las metodologías de la presente invención.

Los anticuerpos que se unen específicamente a un segmento preferido de A β sin unión a otras reacciones de A β tienen varias ventajas en relación con anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o sueros policlonales con A β intacto. En primer lugar, para dosificaciones de masa igual, las dosificaciones de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una dosificación molar más alta de anticuerpos eficaces en la eliminación de placas amiloides. En segundo lugar, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación frente a depósitos amiloides sin inducir una respuesta de eliminación frente a polipéptido APP intacto, reduciendo de este modo los efectos secundarios potenciales.

1. Producción de anticuerpos no humanos

La presente invención presenta anticuerpos no humanos, por ejemplo, anticuerpos que tienen especificidad por los epítopos de A β preferidos de la invención. Tales anticuerpos pueden usarse en la formulación de diversas composiciones terapéuticas de la invención o, preferentemente, proporcionan regiones determinantes de complementariedad para la producción de anticuerpos humanizados o quiméricos (descritos en detalle posteriormente). La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murinos, de cobaya, de primate, de conejo o de rata, puede conseguirse, por ejemplo, inmunizando al animal con A β . También puede usarse un polipéptido más largo que comprende A β o un fragmento inmunogénico de A β o anticuerpos anti-idiotípicos para un anticuerpo de A β . Véase Harlow & Lane, mencionado anteriormente. Un inmunógeno tal puede obtenerse de una fuente natural, por síntesis peptídica o por expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse fusionado o en complejo de otro modo con una proteína vehículo, como se describe posteriormente. Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse con un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con un antígeno aumenta la respuesta inmune al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmune por varios mecanismos incluyendo reclutamiento de linfocitos, estimulación de linfocitos B y/o T y

estimulación de macrófagos. Pueden usarse varios tipos de adyuvantes como se describe posteriormente. Se prefiere adyuvante completo de Freund seguido de adyuvante incompleto para inmunización de animales de laboratorio.

5 Normalmente se usan conejos o cobayas para realización de anticuerpos policlonales. La preparación a modo de ejemplo de anticuerpos policlonales, por ejemplo, para protección pasiva, puede realizarse como sigue. Se inmunizan 125 ratones no transgénicos con 100 µg de Aβ1-42, más adyuvante CFA/IFA, y se sacrifican a los 4-5 meses. Se recoge sangre de ratones inmunizados. Se separa IgG de otros componentes de la sangre. Los anticuerpos específicos para el inmunógeno pueden purificarse parcialmente por cromatografía de afinidad. Se obtiene una media de aproximadamente 0,5-1 mg de anticuerpo específico de inmunógeno por ratón dando un total de 60-120 mg.

10 Se usan normalmente ratones para realizar anticuerpos monoclonales. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales frente a un fragmento inyectando el fragmento o forma más larga de Aβ en un ratón, preparando hibridomas y explorando los hibridomas con respecto a un anticuerpo que se une específicamente a Aβ. Opcionalmente, los anticuerpos se exploran con respecto a unión con una región específica o fragmento deseado de Aβ sin unión a otros fragmentos no solapantes de Aβ. Esta última exploración puede conseguirse determinando la unión de un anticuerpo con una colección de mutantes de delección de un péptido Aβ y determinando qué mutantes de delección se unen al anticuerpo. La unión puede evaluarse, por ejemplo, por transferencia de Western o ELISA. El fragmento más pequeño que muestre unión específica con el anticuerpo define el epítipo del anticuerpo. Como alternativa, la especificidad de epítopos puede determinarse por un ensayo de competición en el que un anticuerpo de ensayo y de referencia compiten por unión a Aβ. Si los anticuerpos de ensayo y referencia compiten, entonces se unen al mismo epítipo o epítopos de forma suficientemente próxima de modo que la unión de un anticuerpo interfiere con la unión del otro. El isotipo preferido para tales anticuerpos es isotipo de ratón IgG2A o isotipo equivalente en otra especie. El isotipo IgG2A de ratón es el equivalente del isotipo IgG1 humano (por ejemplo, IgG1 humano).

25 2. Anticuerpos quiméricos y humanizados

La presente invención también presenta anticuerpos quiméricos y/o humanizados (es decir, inmunoglobulinas quiméricas y/o humanizadas) específicos de péptido beta amiloide. Los anticuerpos quiméricos y/o humanizados tienen la misma o similar especificidad de unión y afinidad que un anticuerpo de ratón u otros no humanos que proporciona el material de partida para construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado.

30 a. Producción de anticuerpos quiméricos

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, normalmente por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos (C), tales como IgG1 e IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Un anticuerpo quimérico típico es por lo tanto una proteína híbrida que consiste en el dominio de unión a antígeno o V de un anticuerpo de ratón y el dominio efector o C de un anticuerpo humano.

b. Producción de anticuerpos humanizados

40 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una cadena que comprende restos flanqueantes de región variable sustancialmente de una cadena de anticuerpo humana (denominada inmunoglobulina o anticuerpo aceptor) y al menos una región determinante de complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (denominado inmunoglobulina o anticuerpo donador). Véase, Queen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989), documentos US 5.530.101, US 5.585.089, US 5.693.761, US 5.693.762, Selick y col., documento WO 90/07861 y Winter, documento US 5.225.539). La región o las regiones constantes, si están presentes, también son sustancialmente o completamente de una inmunoglobulina humana.

45 La sustitución de CDR de ratón en un armazón de dominio variable humano muy probablemente dará como resultado retención de su orientación espacial correcta si el armazón de dominio variable humano adopta la misma o similar conformación que el armazón variable de ratón del que se originan las CDR. Esto se consigue obteniendo los dominio variables humanos de anticuerpos humanos cuyas secuencias flanqueantes muestran un alto grado de identidad de secuencia con los dominios flanqueantes variables murinos de los que derivaron las CDR. Las regiones flanqueantes variables de cadena pesada y ligera pueden derivar de la misma o diferentes secuencias de anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpo humano pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos de origen natural o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Kettleborough y col., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger y col., Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter y col., documento WO 92/22653.

55 Habiendo identificado las regiones determinantes de complementariedad de la inmunoglobulina donadora murina e inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa es determinar que restos, si los hubiera, de estos componentes deberían sustituirse para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En

- general, la sustitución de restos aminoacídicos humanos con murinos debería minimizarse, debido a que la introducción de restos murinos aumenta el riesgo de que el anticuerpo induzca una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) en seres humanos. Pueden realizarse procedimientos reconocidos en la técnica para determinar respuesta inmune para controlar una respuesta HAMA en un paciente particular o durante ensayos clínicos. Puede realizarse una evaluación de inmunogenicidad para anticuerpos humanizados administrados a pacientes al comienzo y a lo largo de la administración de dicha terapia. La respuesta HAMA se mide, por ejemplo, detectando anticuerpos para el reactivo terapéutico humanizado, en muestras de suero del paciente usando un procedimiento conocido por los expertos en la materia, incluyendo tecnología de resonancia de plasmón superficial (BIACORE) y/o análisis de ELISA de fase sólida.
- 5
- 10 Ciertos aminoácidos de los restos flanqueantes de región variable humana se seleccionan para sustitución basándose en su posible influencia en la conformación de CDR y/o unión a antígeno. La yuxtaposición no natural de regiones CDR murinas para región flanqueante variable humana puede dar como resultado restricciones conformacionales no naturales, que, a no ser que se corrijan por sustitución de ciertos restos aminoacídicos conducen a pérdida de la afinidad de unión.
- 15 La selección de restos aminoacídicos para sustitución se determina, en parte, por realización de modelos informáticos. Se describe hardware y software informático en el presente documento para producir imágenes tridimensionales de moléculas de inmunoglobulina. En general, se producen modelos moleculares partiendo de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o dominios de las mismas. Las cadenas para modelar se comparan con respecto a similitud de secuencia de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas y las cadenas o dominios que muestran mayor similitud de secuencia se seleccionan como punto de partida para construcción del modelo molecular. Las cadenas o dominios que comparten al menos el 50 % de identidad de secuencia se seleccionan para realización de modelos, y preferentemente las que comparten al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de identidad de secuencia o más se seleccionan para realización de modelos. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas de inmunoglobulina o dominios que se modelan, y los de la estructura de partida. Las estructuras modificadas se ensamblan después en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina por minimización de energía y verificando que todos los átomos están dentro de distancias apropiadas entre sí y que las longitudes y ángulos de enlace están dentro de los límites químicamente aceptables.
- 20
- 25 La selección de restos aminoacídicos para sustitución también puede determinarse, en parte, por examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, u observación empírica de los efectos de sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto flanqueante de región variable murina y resto flanqueante de región variable humana seleccionada, el aminoácido flanqueante humano habitualmente debería sustituirse por el aminoácido flanqueante equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:
- 30
- 35 (1) se una de forma no covalente al antígeno directamente,
 (2) sea adyacente a la región CDR,
 (3) interaccione de otro modo con una región CDR (por ejemplo, esté a una distancia aproximada de 3-6 Å de una región CDR como se determina por realización de modelos informáticos) o
 (4) participe en la interfaz VL-VH.
- 40 Los restos que "se unen de forma no covalente al antígeno directamente" incluyen aminoácidos en posiciones en regiones flanqueantes que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con aminoácidos en el antígeno de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, por enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas y similares.
- 45 Las regiones CDR y flanqueantes son como se define por Kabat y col. o Chothia y col., mencionado anteriormente. Cuando los restos flanqueantes, como se definen por Kabat y col., mencionado anteriormente, constituyen restos de bucles estructurales como se definen por Chothia y col., mencionado anteriormente, los aminoácidos presentes en el anticuerpo de ratón pueden seleccionarse para sustitución en el anticuerpo humanizado. Los restos que están "adyacentes a una región CDR" incluyen restos aminoacídicos en posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las CDR en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, en posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR como se define por Kabat, o una CDR como se define por Chothia (véase por ejemplo, Chothia y Lesk JMB 196:901 (1987)). Es particularmente probable que estos aminoácidos interactúen con los aminoácidos en las CDR y, si se seleccionan del aceptor, distorsionen las CDR donadoras y reduzcan la afinidad. Además, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno (Amit y col., Science, 233:747 (1986) y seleccionar estos aminoácidos del donador puede ser deseable para mantener todos los contactos antigénicos que proporcionan afinidad en el anticuerpo original.
- 50
- 55 Los restos que "interaccionan de otro modo con una región CDR" incluyen los que se determinan por análisis estructural secundario que están en orientación espacial suficiente para afectar a una región CDR. En una realización, los restos que "interaccionan de otro modo con una región CDR" se identifican analizando un modelo tridimensional de la inmunoglobulina donadora (por ejemplo, un modelo generado por ordenador). Un modelo tridimensional, normalmente del anticuerpo donador original, muestra que ciertos aminoácidos fuera de las CDR
- 60

están cerca de las CDR y tienen una buena probabilidad de interactuar con aminoácidos en las CDR por enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En esas posiciones de aminoácidos, puede seleccionarse el aminoácido de inmunoglobulina donadora en lugar del aminoácido de inmunoglobulina aceptora. Los aminoácidos de acuerdo con este criterio tendrán en general un átomo de cadena lateral a una distancia de aproximadamente 3 unidades de angstrom (Å) de algún átomo en las CDR y deben contener un átomo que podría interactuar con los átomos de CDR de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, tales como las enumeradas anteriormente.

En el caso de átomos que pueden formar un enlace de hidrógeno, los 3 Å se miden entre sus núcleos, pero para átomos que no forman un enlace, los 3 Å se miden entre sus superficies de Van der Waals. Por lo tanto, en el último caso, los núcleos deben estar a la distancia de aproximadamente 6 Å (3 Å más la suma de los radios de Van der Waals) para que los átomos se consideren capaces de interactuar. En muchos casos el núcleo estará de 4 o 5 a 6 Å de distancia. En la determinación de si un aminoácido puede interactuar con las CDR, se prefiere no considerar los últimos 8 aminoácidos de CDR 2 de cadena pesada como parte de las CDR, porque desde el punto de vista de la estructura, estos 8 aminoácidos se comportan más como parte del armazón.

Pueden identificarse aminoácidos que sean capaces de interactuar con aminoácidos en las CDR de otra manera más. El área de superficie accesible para el disolvente de cada aminoácido flanqueante se calcula de dos maneras: (1) en el anticuerpo intacto y (2) en una molécula hipotética que consiste en el anticuerpo con sus CDR retiradas. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente 10 angstroms cuadrados o más muestra que el acceso del aminoácido flanqueante al disolvente está al menos parcialmente bloqueado por las CDR y por lo tanto que el aminoácido está en contacto con las CDR. El área de superficie accesible al disolvente de un aminoácido puede calcularse basándose en un modelo tridimensional de un anticuerpo, usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) y Lee y Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971)). Los aminoácidos flanqueantes pueden también interactuar ocasionalmente con las CDR de forma indirecta, afectando a la conformación de otro aminoácido flanqueante que a su vez entra en contacto con las CDR.

Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en el armazón son importantes para determinar confirmación de CDR (por ejemplo, capaz de interactuar con las CDR) en muchos anticuerpos (Chothia y Lesk, mencionado anteriormente, Chothia y col., mencionado anteriormente y Tramontano y col., J. Mol. Biol. 215: 175 (1990)). Estos autores identificaron restos flanqueantes conservados importantes para la conformación de CDR por análisis de las estructuras de varios anticuerpos conocidos. Los anticuerpos analizados quedaron en un número limitado de clases estructurales o "canónicas" basándose en la conformación de las CDR. Los restos flanqueantes conservados dentro de miembros de una clase canónica se denominan restos "canónicos". Los restos canónicos incluyen restos 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 y 95 de la cadena ligera y los restos 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 y 94 de la cadena pesada. Los restos adicionales (por ejemplo restos determinantes de estructura de CDR) pueden identificarse de acuerdo con la metodología de Martin y Thorton (1996) J. Mol. Biol. 263: 800. Resulta notable que se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48; 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat) son capaces de interactuar con las CDR en muchos anticuerpos. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también interactúan probablemente con las CDR. Pueden identificarse restos adicionales que pueden efectuar conformación de las CDR de acuerdo con la metodología de Foote y Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487. Tales restos se denominan restos de "vernier" y son los restos en la región flanqueante que subyacen estrechamente (es decir, forman una "plataforma" bajo) las CDR. En todas estas posiciones numeradas, se prefiere que la selección de aminoácido donador en lugar del aminoácido aceptor (cuando difieren) esté en la inmunoglobulina humanizada. Por otro lado, ciertos restos capaces de interactuar con la región CDR, tales como los primeros 5 aminoácidos de la cadena ligera, pueden en ocasiones seleccionarse de la inmunoglobulina aceptora sin pérdida de afinidad en la inmunoglobulina humanizada.

Los restos que "participan en la interfaz VL-VH" o "restos de empaquetamiento" incluyen los restos en la interfaz entre VL y VH como se define, por ejemplo, por Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-66 (1985) o Chothia y col, mencionado anteriormente. Generalmente, los restos de empaquetamiento inusuales deberían conservarse en el anticuerpo humanizado si difieren de los de los armazones humanos.

En general, uno o más de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores pueden sustituirse. En algunas realizaciones, todos o la mayoría de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores se sustituyen. Ocasionalmente, existe cierta ambigüedad acerca de si un aminoácido particular cumple los criterios anteriores y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular, la otra de las cuales no. Las inmunoglobulinas variantes alternativas producidas de este modo pueden ensayarse en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento con respecto a la actividad deseada y se selecciona la inmunoglobulina preferida.

Habitualmente las regiones CDR en anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas y, más habitualmente, idénticas a las regiones CDR correspondientes del anticuerpo donador. Sin embargo, en ciertas realizaciones, puede ser deseable modificar una o más regiones CDR para modificar la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Normalmente, uno o más restos de una CDR se alteran para modificar la unión para conseguir una tasa de asociación de unión más favorecida, una tasa de disociación de unión más favorecida, o ambas, de modo que se consigue una constante de unión ideal. Usando esta estrategia, puede

conseguirse un anticuerpo que tenga afinidad de unión ultra alta de, por ejemplo, 10^{10} M^{-1} o más. Brevemente, se hace referencia a la secuencia de CDR donadora como una secuencia base a partir de la cual se alteran después uno o más restos. Las técnicas de maduración de afinidad, como se describen en el presente documento, pueden usarse para alterar la región o regiones CDR seguido de exploración de las moléculas de unión resultantes para el cambio deseado en la unión. El procedimiento también puede usarse para alterar la CDR donadora, normalmente una CDR de ratón, para que sea menos inmunogénica de modo que se minimiza o se evita una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) potencial. En consecuencia, a medida que se altera la CDR o las CDR, pueden controlarse los cambios de la afinidad de unión así como inmunogenicidad y puntuarse de modo que se consiga un anticuerpo optimizado para la mejor unión combinada y baja inmunogenicidad (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.656.467 y Patente Publicada de Estados Unidos US20020164326A1).

En otro enfoque, las regiones CDR del anticuerpo se analizan para determinar las contribuciones de cada CDR individual a la unión de anticuerpo y/o inmunogenicidad reemplazando sistemáticamente cada una de las CDR donadoras con un homólogo humano. El panel resultante de anticuerpos humanizados se puntúa después con respecto a afinidad por el antígeno e inmunogenicidad potencial de cada CDR. De esta manera, se determinan las dos propiedades clínicamente importantes de una molécula de unión candidata, es decir, unión a antígenos y baja inmunogenicidad. Si los sueros del paciente contra una forma murina correspondiente o con injerto de CDR (humanizada) del anticuerpo está disponible, entonces el panel completo de anticuerpos que representan los intercambios de CDR humana sistemáticos puede explorarse para determinar la respuesta antiidiotípica de los pacientes frente a cada CDR donadora (para detalles técnicos, véase, por ejemplo, Iwashii y col., *Mol. Immunol.* 36: 1079-91 (1999)). Un enfoque tal permite identificar regiones CDR donadoras esenciales a partir de CDR donadoras no esenciales. Las regiones CDR donadoras no esenciales pueden después intercambiarse con una CDR homóloga humana. Cuando una región CDR esencial no puede intercambiarse sin pérdida inaceptable de función, la identificación de los restos determinantes de especificidad (SDR) de la CDR se realiza por, por ejemplo, mutagénesis dirigida. De esta manera, la CDR puede después volver a modificarse por ingeniería genética para conservar solamente los SDR y ser humana y/o mínimamente inmunogénica en las posiciones de aminoácidos restantes a lo largo de la CDR. Un enfoque tal, en el que solo se injerta una parte de la CDR donadora, también se denomina injerto de CDR abreviado (para detalles técnicos de las técnicas anteriores, véase, por ejemplo, Tamura y col., *J. of Immunology* 164(3): 1432-41. (2000); Gonzales y col., *Mol. Immunol* 40: 337-349 (2003); Kashmiri y col., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38: 3-16 (2001) y De Pascalis y col., *J. of Immunology* 169(6): 3076-84. (2002).

Además, es posible en ocasiones realizar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de restos de CDR sin afectar de forma apreciable a la afinidad de unión de la inmunoglobulina humanizada resultante. Por sustituciones conservativas se entienden combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

Son candidatos adicionales para sustitución los aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que son inusuales o "poco comunes" para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donador de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Por ejemplo, puede ser deseable sustitución cuando el aminoácido en una región flanqueante humana de la inmunoglobulina aceptora es poco común para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es común para esa posición en secuencias de inmunoglobulina humana; o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina aceptora es poco común para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora también es poco común, en relación con otras secuencias humanas. Si un resto es poco común para secuencias flanqueantes humanas aceptoras también debería considerarse cuando se seleccionan restos para retromutación basándose en contribución a la conformación de CDR. Por ejemplo si la retromutación da como resultado sustitución de un resto que es poco común para secuencias flanqueantes humanas aceptoras, puede ensayarse un anticuerpo humanizado con y sin con respecto a actividad. Si la retromutación no es necesaria para la actividad, esta puede eliminarse para reducir riesgos de inmunogenicidad. Por ejemplo, la retromutación en los siguientes restos puede introducir un resto que es poco común en las secuencias flanqueantes humanas aceptoras; uk= v2(2,0 %), L3 (0,4 %), T7 (1,8 %), Q18 (0,2 %), L83 (1,2 %), I85 (2,9 %), A100 (0,3 %) y L106 (1,1 %); y vh = T3 (2,0 %), K5 (1,8 %), I11 (0,2 %), S23 (1,5 %), F24 (1,5 %), S41 (2,3 %), K71 (2,4 %), R75 (1,4 %), I82 (1,4 %), D83 (2,2 %) y L109 (0,8 %). Estos criterios ayudan a asegurar que un aminoácido atípico en el armazón humano no interrumpa la estructura del anticuerpo. Además, reemplazando un aminoácido aceptor humano inusual con un aminoácido del anticuerpo donador que resulta ser típico para anticuerpos humanos, el anticuerpo humanizado puede hacerse menos inmunogénico.

La expresión "poco común", como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en esa posición en menos de aproximadamente el 20 %, preferentemente menos de aproximadamente el 10 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 5 %, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 3 %, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 2 % y aún más preferentemente menos de aproximadamente el 1 % de las secuencias en una muestra representativa de secuencias y el término "común", como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en más de aproximadamente el 25 % pero habitualmente más de aproximadamente el 50 % de las secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es "poco común" o "común", con frecuencia será preferible considerar solamente secuencias de región variable humanas y cuando se decida si un aminoácido de ratón es "poco común" o "común", solo secuencias de región variable de ratón. Además, todas las

secuencias de región variable de cadena pesada y ligera humanas se agrupan respectivamente en "subgrupos" de secuencias que son especialmente homólogas entre sí y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat y col., mencionado anteriormente). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es "poco común" o "común" entre secuencias humanas, con frecuencia será preferible considerar solamente las secuencias humanas en el mismo subgrupo que la secuencia aceptora.

Son candidatos adicionales para sustitución los aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que se identificarían como parte de una región CDR según la definición alternativa propuesta por Chothia y col., mencionado anteriormente. Son candidatos adicionales para sustitución los aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que se identificarían como parte de una región CDR según las definiciones de AbM y/o de contacto.

Son candidatos adicionales para sustitución los restos flanqueantes aceptores que corresponden a un resto flanqueante donador poco común o inusual. Los restos flanqueantes donadores poco comunes o inusuales son los que son poco comunes o inusuales (como se define en el presente documento) para anticuerpos murinos en esa posición. Para anticuerpos murinos, el subgrupo puede determinarse de acuerdo con Kabat y pueden identificarse posiciones de los restos que difieren del consenso. Estas diferencias específicas del donador pueden apuntar a mutaciones somáticas en la secuencia murina que potencian la actividad. Se conservan restos inusuales que se predice que afectan a la unión (por ejemplo, empaquetamiento de restos canónicos y/o de vernier), mientras que pueden sustituirse restos que se ha predicho que son poco importantes para unión. Los restos poco comunes dentro de la secuencia 12A11 UK incluyen I85 (3,6 %). Los restos poco comunes dentro de la secuencia 12A11 vh incluyen T3 (1,0 %), I11 (1,7 %), L12 (1,7 %), S41 (2,8 %), D83 (1,8 %) y A85 (1,8 %).

Son candidatos adicionales para sustitución restos no de línea germinal que aparecen en una región flanqueante aceptora. Por ejemplo, cuando una cadena de anticuerpo aceptor (es decir, una cadena de anticuerpo humano que comparte identidad de secuencia significativa con la cadena de anticuerpo donadora) se alinea con una cadena de anticuerpo de línea germinal (que comparte de forma similar identidad de secuencia significativa con la cadena donadora), los restos que no coinciden entre el armazón de cadena aceptora y el armazón de cadena de línea germinal pueden sustituirse con restos correspondientes de la secuencia de línea germinal.

Además de las sustituciones de aminoácidos específicas analizadas anteriormente, las regiones flanqueantes de inmunoglobulinas humanizadas son habitualmente sustancialmente idénticas y, más habitualmente, idénticas a las regiones flanqueantes de los anticuerpos humanos de los que derivaron. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región flanqueante realizan poca o ninguna contribución directa a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Por lo tanto, muchas sustituciones conservativas individuales de restos flanqueantes pueden tolerarse sin cambio apreciable de la especificidad o afinidad de la inmunoglobulina humanizada resultante. Por lo tanto, en una realización la región flanqueante variable de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos el 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de región flanqueante variable humana o consenso de tales secuencias. En otra realización, la región flanqueante variable de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos el 90 %, preferentemente el 95 %, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de región flanqueante variable humana o consenso de tales secuencias. En general, sin embargo, tales sustituciones no son deseables.

En realizaciones a modo de ejemplo, los anticuerpos humanizados de la invención muestran una afinidad de unión específica para antígeno de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden tener afinidades de unión de al menos 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} M⁻¹. Habitualmente el límite superior de la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados para antígeno está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la de la inmunoglobulina donadora. Con frecuencia, el límite inferior de la afinidad de unión también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la de la inmunoglobulina donadora. Como alternativa, la afinidad de unión puede compararse con la de un anticuerpo humanizado que no tiene sustituciones (por ejemplo, un anticuerpo que tiene CDR donadoras y FR aceptoras, pero no sustituciones de FR). En tales casos, la unión del anticuerpo optimizado (con sustituciones) es preferentemente al menos de dos a tres veces mayor o de tres a cuatro veces mayor, que la del anticuerpo no sustituido. Para realizar comparaciones, puede determinarse la actividad de los diversos anticuerpos, por ejemplo, por BIACORE (es decir, resonancia de plasmón superficial usando reactivos no marcados) o ensayos de unión competitiva.

c. Producción de Anticuerpos 12A11 Humanizados

Una realización preferida de la presente invención presenta un anticuerpo humanizado para el extremo N-terminal de Aβ, en particular, para su uso en las metodologías terapéuticas y/o de diagnóstico descritas en el presente documento. Un material de partida particularmente preferido para la producción de anticuerpos humanizados es el anticuerpo monoclonal 12A11. 12A11 es específico del extremo N-terminal de Aβ y se ha mostrado que (1) tiene una alta avidéz por Aβ-42 agregado, (2) tiene la capacidad de capturar Aβ soluble y (3) media en la fagocitosis (por ejemplo, induce fagocitosis) de placa amiloide (véase Ejemplo I). La eficacia *in vivo* del anticuerpo 12A11 se describe en el Ejemplo II. La clonación y secuenciación de ADNc que codifica las regiones variables de cadenas pesada y ligera del anticuerpo 12A11 se describen en el Ejemplo III.

Las secuencias de anticuerpos aceptores humanos adecuados pueden identificarse por comparaciones por

ordenador de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se realiza de forma separada para cadenas separadas y ligeras pero los principios son similares para cada una. En particular, los dominios variables de anticuerpos humanos cuyas secuencias flanqueantes muestran un alto grado de identidad de secuencia con las regiones flanqueantes VL y VH murinas se identifican por consulta de, por ejemplo, la Base de Datos de Kabat o la Base de Datos de Secuencias de Proteínas IgG usando NCBI IgG BLAST (accesibles públicamente a través del servidor de internet de NCBI de los Institutos Nacionales de Salud) con las secuencias flanqueantes murinas respectivas. En una realización, se seleccionan secuencias aceptoras que comparten más del 50 % de identidad de secuencia con secuencias donadoras murinas, por ejemplo, secuencias flanqueantes donadoras (FR). Preferentemente, se seleccionan secuencias de anticuerpo aceptor que comparten el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % de identidad de secuencia o más.

Una comparación por ordenador de 12A11 reveló que la cadena ligera de 12A11 (subgrupo de ratón II) muestra la mayor identidad de secuencia con cadenas ligeras humanas de subtipo kappa II, y que la cadena pesada de 12A11 (subgrupo de ratón Ib) muestra mayor identidad de secuencia con cadenas pesadas humanas de subtipo II, como se define por Kabat y col., mencionado anteriormente. Las regiones flanqueantes humanas ligeras y pesadas pueden derivar de anticuerpos humanos de estos subtipos, o de secuencias consenso de tales subtipos. En un primer intento de humanización, las regiones flanqueantes variables de cadena ligera derivaron de anticuerpos del subgrupo humano II. Basándose en experimentos anteriores diseñados para conseguir altos niveles de expresión de anticuerpos humanizados que tenían regiones flanqueantes variables de cadena pesada derivadas de anticuerpos de subgrupo humano II, se descubrió que los niveles de expresión de tales anticuerpos eran en ocasiones bajos. En consecuencia, basándose en los razonamientos descritos en Saldanha y col. (1999) Mol Immunol.36: 709-19, se seleccionaron regiones flanqueantes de anticuerpos de subgrupo humano III en lugar de subgrupo humano II.

Se identificó un anticuerpo de subgrupo humano II K64 (AIMS4) (Nº de acceso BAC01733) a partir de la base de datos no redundante de NCBI que tenía identidad de secuencia significativa dentro de las regiones variables de cadena ligera de 12A11. Se identificó un anticuerpo del subgrupo humano III M72 (Nº de acceso AAA69734) a partir de la base de datos no redundante del NCBI que tenía identidad de secuencia significativa dentro de las regiones variables de cadena pesada de 12A11 (véase también Schroeder y Wang (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 872: 6146-6150).

Las secuencias aceptoras de cadena ligera alternativas incluyen, por Ejemplo, Nº de acceso de PDB 1KFA (gi24158782), Nº de acceso de PDB 1KFA (gi24158784), Nº de acceso de EMBL CAE75574.1 (gi38522587), Nº de acceso de EMBL CAE75575.1 (gi38522590), Nº de acceso de EMBL CAE84952.1 (gi39838891), Nº de acceso de DJB BAC01734.1 (gi21669419), Nº de acceso de DJB BAC01730.1 (gi21669411), Nº de acceso de PIR S40312 (gi481978), Nº de acceso de EMBL CAA51090.1 (gi3980118), Nº de acceso de GenBank AAH63599.1 (gi39794308), Nº de acceso de PIR S22902 (gi106540), Nº de acceso de PIR S42611 (gi631215), Nº de acceso de EMBL CAA38072.1 (gi433890), Nº de acceso de GenBank No. AAD00856.1 (gi4100384), Nº de acceso de EMBL CAA39072.1 (gi34000), Nº de acceso de PIR S23230 (gi284256), Nº de acceso de DBJ BAC01599.1 (gi21669149), Nº de acceso de DBJ BAC01729.1 (gi21669409), Nº de acceso de DBJ BAC01562.1 (gi21669075), Nº de acceso de EMBL CAA85590.1 (gi587338), Nº de acceso de GenBank AAQ99243.1 (gi37694665), Nº de acceso de GenBank AAK94811.1 (gi18025604), Nº de acceso de EMBL CAB51297.1 (gi5578794), Nº de acceso de DBJ BAC01740.1 (gi21669431) y Nº de acceso de DBJ BAC01733.1 (gi21669417). Las secuencias aceptoras de cadena pesada alternativas incluyen, por ejemplo, Nº de acceso de GenBank AAB35009.1 (gi1041885), Nº de acceso de DBJ BAC01904.1 (gi21669789), Nº de acceso de GenBank AAD53816.1 (gi5834100), Nº de acceso de GenBank AAS86081.1 (gi46254223), Nº de acceso de DBJ BAC01462.1 (gi21668870), Nº de acceso de GenBank AAC18191.1 (gi3170773), Nº de acceso de DBJ BAC02266.1 (gi21670513), Nº de acceso de GenBank AAD56254.1 (gi5921589), Nº de acceso de GenBank AAD53807.1 (gi5834082), Nº de acceso de DBJ BAC02260.1 (gi21670501), Nº de acceso de GenBank AAC18166.1 (gi3170723), Nº de acceso de EMBL CAA49495.1 (gi33085), Nº de acceso de PIR S31513 (gi345903), Nº de acceso de GenBank AAS86079.1 (gi46254219), Nº de acceso de DBJ BAC01917.1 (gi21669815), Nº de acceso de DBJ BAC01912.1 (gi21669805), Nº de acceso de GenBank AAC18283.1 (gi3170961), Nº de acceso de DBJ BAC01903 (gi21669787), Nº de acceso de DBJ BAC01887.1 (gi21669755), Nº de acceso de Nº de acceso de DBJ BAC02259.1 (gi21370499), Nº de acceso de DBJ BAC01913.1 (gi21669807), Nº de acceso de DBJ BAC01910.1 (gi21669801), Nº de acceso de DJB BAC02267.1 (gi21670515), Nº de acceso de GenBank AAC18306.1 (gi3171011), Nº de acceso de GenBank AAD53817.1 (gi5834102), Nº de acceso de PIR E36005 (gi106423), Nº de acceso de EMBL CAB37129.1 (gi4456494) y Nº de acceso de GenBank AAA68892.1 (gi186190).

En realizaciones a modo de ejemplo, los anticuerpos humanizados de la invención incluyen CDR y FR de 12A11 de una secuencia aceptor enumerada anteriormente. Los restos dentro de las regiones flanqueantes importantes para conformación de CDR y/o actividad como se describe en el presente documento se seleccionan para retromutación (si difieren entre las secuencias donadoras y aceptoras).

Los restos se seleccionan a continuación para sustitución, como sigue. Cuando un aminoácido difiere entre una región flanqueante variable 12A11 y una región flanqueante variable humana equivalente, el aminoácido flanqueante humano debería habitualmente sustituirse por el aminoácido de ratón equivalente si se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una de forma no covalente al antígeno directamente,
 (2) sea adyacente a una región CDR, sea aparte de una región CDR según la definición alternativa propuesta por Chothia y col., mencionado anteriormente, o interacción de otro modo con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 3Å de una región CDR) o
 (3) participe en la interfaz VL-VH

5 Se describe el análisis estructural de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 12A11 y humanización del anticuerpo 12A11 en el Ejemplo V. Brevemente, se estudiaron modelos tridimensionales para las estructuras de anticuerpo murino resueltas 1KTR para la cadena ligera y 1JRH y 1ETZ para la cadena pesada. Los modelos tridimensionales alternativos que pueden estudiarse para identificación de restos, importantes para confirmación de CDR (por ejemplo, restos de vernier), incluyen N° de acceso de PDB 2JEL (gi3212688), N° de acceso de PDB 1TET (gi494639), N° de acceso de PDB IJP5 (gi16975307), N° de acceso de PDB 1CBV (gi493917), N° de acceso de PDB 2PCP (gi4388943), N° de acceso de PDB 1I9I (gi2050118), N° de acceso de PDB 1CLZ (gi1827926), N° de acceso de PDB 1FL6 (gi17942615) y N° de acceso de PDB 1KEL (gi 1942968) para la cadena ligera y PDB 1GGI (gi442938), N° de acceso de PDB 1GGB (gi442934), N° de acceso de PDB 1N5Y (gi28373913), N° de acceso de PDB 2HMI (gi3891821), N° de acceso de PDB 1FDL (gi229915), N° de acceso de PDB 1KIP (gi1942788), N° de acceso de PDB 1KIQ (gi1942791) y N° de acceso de PDB 1VFA (gi576325) para la cadena pesada.

20 La información estructural tridimensional para los anticuerpos descritos en el presente documento está disponible públicamente, por ejemplo, del Banco de Datos de Proteínas del Laboratorio de Investigación para Bioinformática Estructural (PDB). Se puede acceder libremente al PDB a través de Internet y se describe por Berman y col. (2000) Nucleic Acids Research, 28: 235. El estudio de las estructuras tridimensionales resueltas permite la identificación de restos que interactúan con CDR dentro de 12A11. Como alternativa, pueden generarse modelos tridimensionales para las cadenas VH y VL de 12A11 usando software de realización de modelos por ordenador. Brevemente, se genera un modelo tridimensional basándose en las estructuras de anticuerpo murino resueltas más cercanas para las cadenas pesada y ligera. Para este fin, puede usarse 1KTR como un molde para realizar el modelo de la cadena ligera de 12A11, y 1ETZ y 1JRH pueden usarse como moldes para realización de modelos de la cadena pesada. El modelo puede refinarse adicionalmente por una serie de etapas de minimización de energía para disipar contactos atómicos desfavorables y optimizar interacciones electroestáticas y de van der Waals. Puede realizarse análisis tridimensional adicional y/o formación de modelos usando 2JEL (2,5 Å) y/o 1TET (2,3 Å) para la cadena ligera y 1GGI (2,8 Å) para la cadena pesada (u otros anticuerpos expuestos anteriormente) basándose en la similitud entre estas estructuras murinas resueltas y las cadenas de 12A11 respectivas.

35 El modelo informático de la estructura de 12A11 puede actuar adicionalmente como un punto de partida para predecir la estructura tridimensional de un anticuerpo que contiene las regiones determinantes de complementariedad de 12A11 sustituidas en estructuras flanqueantes humanas. Pueden construirse modelos adicionales que representen la estructura a medida que se introducen sustituciones de aminoácidos adicionales.

40 En general, la sustitución de uno, la mayoría o todos los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores es deseable. En consecuencia, los anticuerpos humanizados de la presente invención habitualmente contendrán una sustitución de un resto flanqueante de cadena ligera humana con un resto de 12A11 correspondiente en al menos 1, 2, 3 o más de las posiciones seleccionadas. Los anticuerpos humanizados también contienen habitualmente una sustitución de un resto flanqueante de cadena pesada humana con un resto de 12A11 correspondiente en al menos 1, 2, 3 o más de las posiciones seleccionadas.

45 Ocasionalmente, sin embargo, existe cierta ambigüedad acerca de si un aminoácido particular cumple los criterios anteriores, y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular, la otra de las cuales no. En casos en los que la sustitución con un resto murino introduciría un resto que es poco común en inmunoglobulinas humanas en una posición particular, puede ser deseable ensayar el anticuerpo con respecto a actividad con o sin la sustitución particular. Si la actividad (por ejemplo afinidad de unión y/o especificidad de unión) es aproximadamente la misma con o sin la sustitución, puede preferirse el anticuerpo sin sustitución, puesto que se esperaría que indujera menos respuesta HAMA, como se describe en el presente documento.

50 Otros candidatos para sustitución son aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esta posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente de más inmunoglobulinas humanas típicas. Como alternativa, pueden introducirse aminoácidos de posiciones equivalentes en el 12A11 de ratón en las regiones flanqueantes humanas cuando tales aminoácidos son típicos de inmunoglobulina humana en las posiciones equivalentes.

55 Otros candidatos para sustitución son restos no de línea germinal que aparecen en una región flanqueante. Realizando una comparación por ordenador de 12A11 con secuencias de línea germinal conocidas, pueden identificarse secuencias de línea germinal con el mayor grado de identidad de secuencia con la cadena pesada o ligera. El alineamiento de la región flanqueante y la secuencia de línea germinal revelará qué restos pueden seleccionarse para sustitución con los restos de línea germinal correspondientes. Los restos que no coinciden entre un armazón aceptor de cadena ligera seleccionado y una de estas secuencias de línea germinal podrían seleccionarse para sustitución con el resto de línea germinal correspondiente.

- 5 Se identifican restos de ratón poco comunes comparando las secuencias de VL y/o VH donadoras con las secuencias de otros miembros del subgrupo al que pertenecen las secuencias de VL y/o VH donadoras (de acuerdo con Kabat) e identificando las posiciones de restos que difieren del consenso. Estas diferencias específicas de donador pueden apuntar a mutaciones somáticas que potencian la actividad. Los restos inusuales o poco comunes cercanos al sitio de unión pueden posiblemente entrar en contacto con el antígeno, haciendo deseable conservar el resto de ratón. Sin embargo, si el resto de ratón inusual no es importante para unión, se prefiere el uso del resto aceptor correspondiente puesto que el resto de ratón puede crear neoepitopos inmunogénicos en el anticuerpo humanizado. La situación en la que un resto inusual en la secuencia donadora es de hecho un resto común en la secuencia aceptor correspondiente, el resto preferido es claramente el resto aceptor.
- 10 La Tabla 1A resume el análisis de secuencia de las regiones VH y VL de 12A11.

Tabla 1. Sumario de secuencia de región V de 12A11

Cadena	VL	VH
Subgrupo de ratón	II	Ib
Subgrupo humano	II	II
Aminoácidos poco comunes en vk de ratón (% de frecuencia)	I85 (3,6 %)	III (1,7 %)
Clase canónica de Chothia	L1: clase 4 [16f] L2: clase 1 [7] L3: clase 1 [9]	H1: clase 3 [7] H2: clase 1 [16] H3 ¹
Estructura resuelta de MAb de ratón más cercana	1KTR ²	1ETZ3 (2,6 Å) y 1JRH ⁴
Homología con molde de realización de Modelos	94 %	83 % y 86 %
sec Flanqueante Humana	K64 (BAC01733) (87 % FR, 67 % global)	M72 (AAA69734) (61 % FR, 45 % global)
Notas de donador	Hu k LC subgrupo II CDR del mismo grupo estructural canónico que 12A11	HU HC subgrupo III CDR del mismo grupo estructural canónico que 12A11
Notas de retromutación	Ninguna	A24F, F29L: H1 R71K: Canónico, H2 V371: empaquetamiento T28S, V48L, F67L, N73T, L78V: Vernier
ref de línea germinal para Hu Fr	A19 VL Vk2-28 ARNm: X63397.1 (GI:33774)	AAA69731.1 (GI:567123)
¹ Sin clase canónica pero podría formar una base plegada de acuerdo con las reglas de Shirai y col. (1999) FEBS Lett. 4 55:188-197. ² Kaufmann y col. (2002) J Mol Biol. 318: 135-147. ³ Guddat y col. (2000) J Mol Biol. 302: 853-872. ⁴ Sogabe y col. (1997) J Mol Biol. 273: 882-897.		

Se exponen secuencias de línea germinal que pueden usarse en la selección de sustituciones de aminoácidos.

- 15 La información estructural tridimensional para anticuerpos descritos en el presente documento está públicamente disponible, por ejemplo, del Banco de Datos de Proteínas del Laboratorio de Investigación para Bioinformática Estructural (PDB). Puede accederse libremente al PDB a través de Internet y se describe por Berman y col. (2000) Nucleic Acids Research, p. 235-242. Las secuencias de línea germinal referidas en el presente documento están disponibles públicamente, por ejemplo, de la Base de Datos de Secuencias del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) en colecciones de genes V de línea germinal Igh, Ig kappa e Ig lambda (como una división de
- 20 la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) en los Institutos Nacionales de Salud (NEH)). La búsqueda de homología de la base de datos de "Genes de Línea Germinal Ig" del NCBI se proporciona por IgG BLAST™.

- 25 En una realización a modo de ejemplo, un anticuerpo humanizado de la presente invención contiene (i) una cadena ligera que comprende un dominio variable que comprende CDR de VL de 12A11 murino y un armazón aceptor humano, teniendo el armazón cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más restos sustituidos con el resto de 12A11 correspondiente y (ii) una cadena pesada que comprende CDR de VH de 12A11 y un armazón aceptor humano, teniendo el armazón al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más restos sustituidos con el resto de 12A11 correspondiente y, opcionalmente, al menos uno, preferentemente dos o tres restos sustituidos con un resto de línea germinal humana correspondiente.

En otra realización a modo de ejemplo, un anticuerpo humanizado de la presente invención contiene (i) una cadena ligera que comprende un dominio variable que comprende CDR de VL de 12A11 murino y un armazón aceptor humano, teniendo el armazón al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más restos retromutados (es decir, sustituidos con el resto de 12A11 correspondiente), en la que la retromutación o las retromutaciones están en un resto canónico, de empaquetamiento y/o de vernier y (ii) una cadena pesada que comprende CDR de VH 12A11 y un armazón aceptor humano, teniendo el armazón al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más restos retromutados, en la que la retromutación o las retromutaciones están en un resto canónico, de empaquetamiento y/o de vernier. En ciertas realizaciones, las retromutaciones están solamente en restos de empaquetamiento y/o canónicos o están principalmente en restos canónicos y/o de empaquetamiento (por ejemplo, solo 1 o 2 restos de vernier de los restos de vernier que difieren en la secuencia donadora y aceptora están retromutados).

En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados incluyen el menor número de retromutaciones posible conservando a la vez una afinidad de unión comparable a la del anticuerpo donador (o una versión quimérica del mismo). Para llegar a tales versiones, pueden eliminarse diversas combinaciones de retromutaciones y ensayarse los anticuerpos resultantes con respecto a eficacia (por ejemplo, afinidad de unión). Por ejemplo, pueden eliminarse retromutaciones (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 retromutaciones) en restos de vernier o pueden eliminarse retromutaciones en combinaciones de restos de vernier y empaquetamiento, vernier y canónicos o de empaquetamiento y canónicos.

En otra realización, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describe en el presente documento, y además tiene al menos una (preferentemente dos, tres, cuatro o todas) de las siguientes actividades: (1) se une a A β soluble; (2) se une a A β 1-42 agregado (por ejemplo, como se determina por ELISA); (3) captura A β soluble; (4) se une a A β en placas (por ejemplo, tinción de placas de AD y/o PDAPP); (5) se une a A β con una afinidad no menor de dos a tres veces por debajo del 12A11 quimérico (por ejemplo, 12A11 que tiene secuencias de región variable murina y secuencias de región constante humanas); (6) media en la fagocitosis de A β (por ejemplo, en un ensayo de fagocitosis *ex vivo*, como se describe en el presente documento); y (7) cruza la barrera hematoencefálica (por ejemplo, demuestra localización en el cerebro a corto plazo, por ejemplo, en un modelo animal de PDAPP, como se describe en el presente documento).

En otra realización, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describe en el presente documento, de modo que se una a A β de una manera o con una afinidad suficiente para inducir al menos uno de los siguientes efectos *in vivo*: (1) reducir la carga de placas A β ; (2) prevenir la formación de placas; (3) reducir los niveles de A β soluble; (4) reducir la patología neurítica asociada con un trastorno amiloidogénico; (5) reducir o aliviar al menos un síntoma fisiológico asociado con un trastorno amiloidogénico; y/o (6) mejorar la función cognitiva.

En otra realización, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describe en el presente documento y se une específicamente a un epítipo que comprende los restos 3-7 de A β .

En otra realización más, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describen en el presente documento, de modo que se una a un epítipo N-terminal dentro de A β (por ejemplo, se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 3-7 de A β) y es capaz de reducir (1) los niveles de péptido A β ; (2) la carga de placa de A β ; y (3) la carga neurítica o distrofia neurítica asociada con un trastorno amiloidogénico.

Las actividades descritas anteriormente pueden determinarse usando uno cualquiera de una diversidad de ensayos descritos en el presente documento o en la técnica (por ejemplo, ensayos de unión, ensayos de fagocitosis, etc.). Las actividades pueden ensayarse *in vivo* (por ejemplo, usando componentes de ensayo marcados y/o técnicas de captura de imágenes) o *in vitro* (por ejemplo, usando muestras o muestras de ensayo derivadas de un sujeto). Las actividades pueden ensayarse directa o indirectamente. En ciertas realizaciones preferidas, se ensayan criterios de valoración neurológicos (por ejemplo, carga amiloide, carga neurítica, etc.). Tales criterios de valoración pueden ensayarse en sujetos vivos (por ejemplo, en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer o en sujetos humanos, por ejemplo, que se someten a inmunoterapia) usando metodologías de detección no invasivas. Como alternativa, tales criterios de valoración pueden ensayarse en sujetos post mortem. Los ensayos de tales criterios de valoración en modelos animales y/o en sujetos humanos post mortem son útiles en la evaluación de la eficacia de diversos agentes (por ejemplo, anticuerpos humanizados) para usarse en aplicaciones inmunoterapéuticas similares. En otras realizaciones preferidas, pueden evaluarse parámetros conductuales o neurológicos como indicadores de las actividades o los criterios de valoración neuropatológicos anteriores.

3. Producción de Regiones Variables

Habiendo seleccionado conceptualmente los componentes de CDR y armazón de inmunoglobulinas humanizadas, está disponible una diversidad de procedimientos para producir tales inmunoglobulinas. En general, una o más de las regiones determinantes de complementariedad murinas (CDR) de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo pueden humanizarse, por ejemplo, colocarse en el contexto de una o más regiones flanqueantes humanas, usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en cebadores. Brevemente, se diseñan cebadores que son capaces de hibridar con una región o regiones de CDR murina diana que también contienen una secuencia que

solapa y puede hibridar con una región flanqueante humana. En consecuencia, en condiciones apropiadas, los cebadores pueden amplificar una CDR murina a partir de un ácido nucleico molde de anticuerpo murino y añadir al molde amplificado una parte de una secuencia flanqueante humana. De forma similar, pueden diseñarse cebadores que sean capaces de hibridar con una región o regiones flanqueantes humanas diana en la que una reacción de PCR usando estos cebadores da como resultado una región o regiones flanqueantes humanas amplificadas. Cuando cada producto de amplificación después se desnaturaliza, combina e hibrida con el otro producto, la región CDR murina, que tiene secuencia flanqueante humana solapante con la secuencia flanqueante humana amplificada, puede ligarse genéticamente. En consecuencia, en una o más de tales reacciones, una o más regiones CDR murinas pueden ligarse genéticamente con regiones flanqueantes humanas intermedias.

En realizaciones de este tipo, los cebadores también pueden comprender secuencias de reconocimiento de enzima de restricción deseables para facilitar la ingeniería genética de las secuencias amplificadas por PCR resultantes en un segmento genético mayor, por ejemplo, un segmento de cadena ligera o pesada variable, cadena pesada o vector. Además, los cebadores usados para amplificar las regiones CDR murinas o las regiones flanqueantes humanas pueden tener emparejamientos erróneos deseables de modo que se introduzca un codón diferente en la CDR murina o región flanqueante humana. Los emparejamientos erróneos típicos introducen alteraciones en las regiones flanqueantes humanas que preservan o mejoran la orientación estructural de la CDR murina y de este modo su afinidad de unión, como se describe en el presente documento.

Debería entenderse que el enfoque anterior puede usarse para introducir una, dos o las tres regiones CDR murinas en el contexto de regiones flanqueantes humanas intermedias. Se describen procedimientos para amplificar y ligar diferentes secuencias usando PCR basada en cebadores en, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *DNA Cloning*, Vols. 1 y 2, (D.N. Glover, Ed.1985); *PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage, Ed. John Wiley & Sons (1999) (Editor); *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons (1992).

Debido a la degeneración del código genético, una diversidad de secuencias de ácido nucleico codificará cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina. Las secuencias de ácido nucleico deseadas pueden producirse por síntesis de ADN de fase sólida *de novo* o por mutagénesis por PCR de una variante preparada anteriormente del polinucleótido deseado. La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un procedimiento preferido para preparar variantes de sustitución, delección e inserción de ADN del polipéptido diana. Véase Adelman y col., *DNA 2*: 183 (1983). Brevemente, el ADN del polipéptido diana se altera hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con un molde de ADN monocatenario. Después de la hibridación se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa del molde que incorpora un cebador oligonucleotídico y codifica la alteración seleccionada en el ADN polipeptídico diana.

4. Selección de Regiones Constantes

Los segmentos variables de anticuerpos producidos como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos o humanizados) se ligan normalmente con al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (región Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Pueden aislarse secuencias de ADN de región constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocidos de una diversidad de células humanas, pero preferentemente linfocitos B inmortalizados (véase Kabat y col., mencionado anteriormente y Liu y col., documento WO 87/02671). Habitualmente, el anticuerpo contendrá regiones constantes tanto de cadena ligera como de cadena pesada. La región constante de cadena pesada habitualmente incluye las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4. Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cuando se desea que el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo humanizado) muestre actividad citotóxica, el dominio constante es habitualmente un dominio constante que se fija a complemento y la clase es normalmente IgG1. Se prefiere isotipo humano IgG1. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas, cadenas ligeras separadas, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera se ligan a través de un espaciador.

5. Expresión de Anticuerpos Recombinantes

Se producen anticuerpos quiméricos y humanizados normalmente por expresión recombinante. Se insertan ácidos nucleicos que codifican regiones variables de cadena ligera y pesada, opcionalmente ligados a regiones constantes, en vectores de expresión. Las cadenas ligeras y pesadas pueden clonarse en el mismo o diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina se ligan operativamente a secuencias de control en el vector o vectores de expresión que aseguran la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina. Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero sin limitación, promotores (por ejemplo, promotores asociados de forma natural o heterólogos), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas (por ejemplo, células COS). Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para

expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y la recogida y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

Estos vectores de expresión son normalmente replicables en los organismos huésped como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Habitualmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina, resistencia a kanamicina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Itakura y col., Patente de Estados Unidos N° 4.704.362).

E. coli es un huésped procarionta particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariontas, también pueden realizarse vectores de expresión, que normalmente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier variedad de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor de fago lambda. Los promotores normalmente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora y tendrán secuencias de sitio de unión de ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Otros microbios, tales como levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables del uso de maltosa y galactosa.

Además de microorganismos, también puede usarse cultivo de células de tejidos de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas). Véase Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Se prefieren de hecho las células eucariotas, debido a que se han desarrollado varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas) en la técnica e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, preferentemente, líneas celulares de mieloma o hibridomas o linfocitos B transformados. Preferentemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen y col., Immunol. Rev. 89: 49 (1986)), y sitios de procesamiento de información necesarios, tales como sitios de unión a ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus de papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co y col., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Como alternativa, pueden incorporarse secuencias codificantes de anticuerpos en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y dispersión posterior en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo Deboer y col., documento US 5.741.957, Rosen, documento US 5.304.489 y Meade y col., documento US 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas ligadas operativamente con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Como alternativa, pueden producirse anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos humanizados) de la invención en plantas transgénicas (por ejemplo, tabaco, maíz, soja y alfalfa). Los vectores de "planticuerpos" mejorados (Hendy y col. (1999) J. Immunol. Methods 231: 137-146) y estrategias de purificación acopladas con un aumento de las especies de cultivo transformables hacen a tales procedimientos un medio práctico y eficaz para producir inmunoglobulinas recombinantes no solamente para terapia humana y animal, sino también para aplicaciones industriales (por ejemplo, anticuerpos catalíticos). Además, se ha mostrado que los anticuerpos producidos por plantas son seguros y eficaces y evitan el uso de materiales derivados de animales y por lo tanto el riesgo de contaminación con un agente de encefalopatía espongiforme transmisible (TSE). Además, las diferencias en los patrones de glucosilación de anticuerpos producidos por células vegetales y de mamífero tienen poco o ningún efecto en la unión o especificidad de antígenos. Además, no se han observado pruebas de toxicidad o HAMA en pacientes que reciben aplicación oral tópica de un anticuerpo IgA dimérico secretor derivado de planta (véase Larrick y col. (1998) Res. Immunol. 149:603-608).

Pueden usarse diversos procedimientos para expresar anticuerpos recombinantes en plantas transgénicas. Por ejemplo, pueden clonarse de forma independiente cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo en vectores de expresión (por ejemplo, vectores de *Agrobacterium tumefaciens*), seguido de la transformación de tejido vegetal *in vitro* con la bacteria recombinante o transformación directa usando, por ejemplo, partículas revestidas con el vector que después se introduce físicamente en el tejido vegetal usando, por ejemplo, biolística. Posteriormente, se reconstituyen plantas completas que expresan cadenas individuales seguido de su cruce sexual, dando como

resultando en última instancia la producción de un anticuerpo completamente ensamblado y funcional. Se han usado protocolos similares para expresar anticuerpos funcionales en plantas de tabaco (véase Hiatt y col. (1989) Nature 342:76-87). En diversas realizaciones, pueden usarse secuencias señal para promover la expresión, unión y plegamiento de cadenas de anticuerpo no ensambladas dirigiendo las cadenas al ambiente vegetal apropiado (por ejemplo, el ambiente acuoso del apoplasto u otros tejidos vegetales específicos incluyendo tubérculos, frutas o semillas) (véase y col. (1995) Bio/Technology 13:1090-1093). También pueden usarse biorreactores vegetales para aumentar la producción de anticuerpos y reducir costes significativamente.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican cadena pesada y ligera y secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, se usa habitualmente transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que puede usarse tratamiento con fosfato cálcico, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus para otros huéspedes celulares. (Véase en general Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989)). Otros procedimientos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase en general, Sambrook y col., mencionado anteriormente). Para producción de animales transgénicos, pueden microinyectarse transgenes en oocitos fertilizados o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias y los núcleos de tales células pueden transferirse a oocitos enucleados.

Cuando se clonan cadenas pesadas y ligeras en vectores de expresión separados, los vectores se cotransfectan para obtener expresión y ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Una vez que se expresan, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación de HPLC, electroforesis en gel y similares (véase en general Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982))). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 a 95 % de homogeneidad y se prefiere más del 98 al 99 % o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

6. Fragmentos de Anticuerpo

También se contemplan dentro del alcance de la presente invención fragmentos de anticuerpo. En una realización, se proporciona fragmentos de anticuerpos no humanos y/o quiméricos. En otra realización, se proporcionan fragmentos de anticuerpos humanizados. Normalmente, estos fragmentos muestran unión específica a antígeno con una afinidad de al menos 10^7 y más normalmente 10^8 o 10^9 M^{-1} . Los fragmentos de anticuerpos humanizados incluyen cadenas pesadas, cadenas ligeras Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv separados. Se producen fragmentos por técnicas de ADN recombinante o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

7. Mapeo de epítomos

Puede realizarse mapeo de epítomos para determinar que determinante antigénico o epítomo de A β se reconoce por el anticuerpo. En una realización, se realiza mapeo de epítomos de acuerdo con análisis de NET de Reemplazo (rNET). El ensayo de mapa de epítomos rNET proporciona información acerca de la contribución de restos individuales dentro del epítomo a la actividad de unión global del anticuerpo. El análisis de rNET usa análogos peptídicos sustituidos sencillos sistemáticos sintetizados. La unión de un anticuerpo que se ensaya se determina frente a péptido nativo (antígeno nativo) y frente a 19 péptidos alternativos "sustituidos sencillos", sustituyéndose cada péptido en una primera posición con uno de 19 aminoácidos no nativos para esa posición. Se genera un perfil que refleja el efecto de la sustitución en la posición con los diversos restos no nativos. Se generan de forma similar perfiles en posiciones sucesivas a lo largo del péptido antigénico. El perfil combinado, o mapa de epítomos (que refleja la sustitución en cada posición con los 19 restos no nativos) puede después compararse con un mapa generado de forma similar para un segundo anticuerpo. Mapas idénticos o sustancialmente similares indican que los anticuerpos que se comparan tienen la misma o similar especificidad de epítomos.

8. Ensayos de Anticuerpos con respecto a Eficacia Terapéutica en Modelos Animales

Se inyecta a cada uno de grupos de ratones PDAPP de 7-9 meses de edad 0,5 mg en PBS de anticuerpos policlonales anti-A β o monoclonales anti-A β específicos. Todas las preparaciones de anticuerpos se purifican para tener niveles de endotoxina bajos. Pueden prepararse monoclonales contra un fragmento inyectando el fragmento o forma más larga de A β en un ratón, preparando hibridomas y explorando los hibridomas con respecto a un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento deseado de A β sin unirse a otros fragmentos no solapantes de A β .

Se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal según se necesite durante un periodo de 4 meses para mantener una concentración de anticuerpos en circulación medida por titulación de ELISA de más de 1/1000 definido por ELISA para A β 42 u otro inmunógeno. Las titulaciones se controlan y los ratones se sacrifican al final de 6 meses de inyecciones. Se realizan histoquímica, niveles de A β y toxicología post mortem. Se usan diez ratones por grupo.

9. Exploración de Anticuerpos con respecto a Actividad de Eliminación

La invención también proporciona procedimientos para explorar un anticuerpo con respecto a actividad en la eliminación de un depósito amiloide o cualquier otro antígeno, o entidad biológica asociada, para la que se desea actividad de eliminación. Para explorar con respecto a actividad frente a un depósito amiloide, se pone en contacto una muestra tisular de un paciente con enfermedad de Alzheimer o un modelo animal que tenga patología de Alzheimer característica con células fagocíticas que portan un receptor de Fc, tales como células microgliales y el anticuerpo que se ensaya en medio *in vitro*. Las células fagocíticas pueden ser un cultivo primario o una línea celular y pueden ser de origen murino (por ejemplo, células BV-2 o C8-B4) o humano (por ejemplo, células THP-1). En algunas realizaciones, los componentes se combinan en un portaobjetos de microscopio para facilitar el control microscópico. En algunos procedimientos, se realizan reacciones múltiples en paralelo en los pocillos de una placa de microtitulación. En un formato tal, puede montarse portaobjetos de microscopio en miniatura separado en los pocillos separados, o puede usarse un formato de detección no microscópico, tal como detección por ELISA de A β . Preferentemente, se realiza una serie de mediciones de la cantidad de depósito amiloide en la mezcla de reacción *in vitro*, comenzado a partir de un valor de línea basal antes de que se haya producido la reacción y uno o más valores de ensayo durante la reacción. El antígeno puede detectarse por tinción, por ejemplo, con un anticuerpo marcado con fluorescencia para A β u otro componente de placas amiloides. El anticuerpo usado para tinción puede ser o no el mismo que el anticuerpo que se ensaya para actividad de eliminación. Una reducción relativa a la línea basal durante la reacción de los depósitos amiloides indica que el anticuerpo que se ensaya tiene actividad de eliminación. Es probable que tales anticuerpos particularmente útiles sean útiles en la prevención o tratamiento de Alzheimer u otras enfermedades amiloidogénicas. Los anticuerpos particularmente útiles para prevenir o tratar Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas incluyen los capaces de eliminar placas amiloides tanto compactas como difusas, por ejemplo, el anticuerpo 12A11 de la presente invención, o versiones quiméricas o humanizadas del mismo.

Pueden usarse procedimientos análogos para explorar anticuerpos con respecto a actividad en eliminación de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo puede usarse para detectar actividad de eliminación frente a prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. Normalmente, la entidad biológica tiene algún papel en enfermedad humana o animal. La actividad biológica puede proporcionarse como una muestra tisular o en forma aislada. Si se proporciona como una muestra tisular, la muestra tisular está preferentemente no fijada para permitir el acceso fácil a los componentes de la muestra tisular y evitar la perturbación de la conformación de los componentes secundaria a la fijación. Los ejemplos de muestras tisulares que pueden ensayarse en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejido que contiene crecimientos benignos tales como verrugas o lunares, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejido infiltrado con células inflamatorias, tejido que porta matrices patológicas entre células (por ejemplo, pericarditis fibrinosa), tejido que porta antígenos aberrantes y tejido cicatrizante. Los ejemplos de entidades biológicas aisladas que pueden usarse incluyen A β , antígenos virales o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos tumorales y moléculas de adhesión. Tales antígenos pueden obtenerse de fuentes naturales, expresión recombinante o síntesis química, entre otros medios. La muestra de tejido o entidad biológica aislada se pone en contacto con células fagocíticas que portan receptores de Fc, tales como monocitos o células microgliales y un anticuerpo para ensayar en un medio. El anticuerpo puede dirigirse a la entidad biológica que se ensaya o a un antígeno asociado con la entidad. En esta última situación, el objeto es ensayar si la entidad biológica se fagocita con el antígeno. Habitualmente, aunque no necesariamente, el anticuerpo y la entidad biológica (en ocasiones con un antígeno asociado), se ponen en contacto entre sí antes de añadir las células fagocíticas. La concentración de la entidad biológica y/o el antígeno asociado que permanece en el medio, si están presentes, se controla después. Una reducción de la cantidad o concentración de antígeno o la entidad biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de eliminación frente al antígeno y/o entidad biológica asociada junto con las células fagocíticas.

10. Anticuerpos Quiméricos / Humanizados que Tienen Función Efectora Alterada

Para los anticuerpos anteriormente descritos de la invención que comprenden una región constante (región Fc), también puede ser deseable alterar la función efectora de la molécula. En general, la función efectora de un anticuerpo reside en la región constante o Fc de la molécula que puede mediar la unión con diversas moléculas efectoras, por ejemplo, proteínas del complemento o receptores de Fc. La unión de complemento con la región Fc es importante, por ejemplo, en la opsonización y lisis de patógenos celulares y la activación de respuestas inflamatorias. La unión de anticuerpo con receptores de Fc, por ejemplo, en la superficie de células efectoras, puede desencadenar varias respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo, por ejemplo, involucramiento y destrucción de patógenos o partículas revestidas de anticuerpo, eliminación de complejos inmunes, lisis de células diana revestidas de anticuerpo por células citolíticas (es decir, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria de anticuerpos y control de la producción de inmunoglobulina.

En consecuencia, dependiendo de una aplicación terapéutica o de diagnóstico particular, pueden ser deseables las funciones inmunes mencionadas anteriormente o solamente funciones inmunes seleccionadas. Alterando la región Fc del anticuerpo, se consiguen diversos aspectos de la función efectora de la molécula, incluyendo potenciación o supresión de diversas reacciones del sistema inmune, con efectos beneficiosos en diagnóstico y terapia.

Pueden producirse anticuerpos de la invención que reaccionan solamente con ciertos tipos de receptores de Fc, por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden modificarse para unirse solamente a ciertos receptores de Fc o, si se desea, carecer de unión a receptor de Fc completamente, por delección o alteración del sitio de unión a receptor de Fc localizado en la región Fc del anticuerpo. Otras alteraciones deseables de la región Fc de un anticuerpo de la invención se catalogan posteriormente. Normalmente, el sistema de numeración de Kabat se usa para indicar qué resto o restos aminoacídicos de la región Fc (por ejemplo, de un anticuerpo IgG) están alterados (por ejemplo, por sustitución de aminoácidos) para conseguir un cambio deseado en la función efectora. El sistema de numeración también se emplea para comparar anticuerpos entre especies de modo que una función efectora deseada observada en, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, puede después modificarse por ingeniería genética de forma sistemática en un anticuerpo humano, humanizado o quimérico de la invención.

Por ejemplo, se ha observado que los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de IgG) pueden agruparse en los que muestran unión estrecha, intermedia o débil con un receptor de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc en monocitos humanos (FcγRI)). Por comparación de las secuencias de aminoácidos en estos diferentes grupos de afinidad, se ha identificado un sitio de unión a monocitos en la región de unión de bisagra (Leu234-Ser239). Además, el receptor FcγRI humano se une a IgG1 humano e IgG2a de ratón como un monómero, pero la unión de IgG2b de ratón es 100 veces más débil. Una comparación de la secuencia de estas proteínas en la región de unión de bisagra muestra que la secuencia 234 a 238, es decir, Leu-Leu-Gly-Gly-Pro (SEC ID N°: 32) en los agentes de unión fuerte se convierte en Leu-Glu-Gly-Gly-Pro (SEC ID N°: 33) en gamma 2b de ratón, es decir, agentes de unión débiles. En consecuencia, puede realizarse un cambio correspondiente en una secuencia bisagra de anticuerpo humano si se desea unión al receptor de FcγI reducida. Se entiende que pueden realizarse otras alteraciones para conseguir el mismo o similares resultados. Por ejemplo, la afinidad de unión a FcγRI puede alterarse reemplazando el resto específico con un resto que tenga un grupo funcional inapropiado en su cadena lateral o introduciendo un grupo funcional cargado (por ejemplo, Glu o Asp) o por ejemplo un resto no polar aromático (por ejemplo, Phe, Tyr o Trp).

Estos cambios pueden aplicarse igualmente a los sistemas murinos, humanos y de rata dada la homología de secuencia entre las diferentes inmunoglobulinas. Se ha mostrado que para IgG3 humana, que se une al receptor FcγRI humano, cambiar Leu 235 a Glu destruye la integración del mutante para el receptor. El sitio de unión para este receptor de este modo activarse o desactivarse realizando la mutación apropiada.

Las mutaciones en sitios adyacentes o cercanos en la región de unión de bisagra (por ejemplo, reemplazando restos 234, 236 o 237 por Ala) indican que las alteraciones en los restos 234, 235, 236 y 237 afectan al menos a la afinidad por el receptor FcγβRI. En consecuencia, los anticuerpos de la invención también pueden tener una región Fc alterada con afinidad de unión alterada por FcγRI en comparación con el anticuerpo no modificado. Un anticuerpo tal tiene convenientemente una modificación en el resto aminoacídico 234, 235, 236 o 237.

La afinidad por otros receptores de Fc puede alterarse por un enfoque similar, para controlar la respuesta inmune de diferentes maneras.

Como ejemplo adicional, las propiedades líticas de los anticuerpos IgG después de la unión del componente C1 del complemento pueden alterarse.

El primer componente del sistema de complemento, C1, comprende tres proteínas como C1q, C1r y C1s que se unen entre sí de forma estrecha. Se ha mostrado que C1q es responsable de la unión del complejo de tres proteínas con un anticuerpo.

En consecuencia, la actividad de unión a C1q de un anticuerpo puede alterarse proporcionando un anticuerpo con un dominio CH 2 alterado en el que al menos uno de los restos aminoacídicos 318, 320 y 322 de la cadena pesada se ha cambiado a un resto que tiene una cadena lateral diferente. La numeración de los restos en la cadena pesada es la del índice EU (véase Kabat y col., mencionado anteriormente). Otras alteraciones adecuadas para alterar, por ejemplo, reducir o suprimir, unión de C1q específica con un anticuerpo incluyen cambiar uno cualquiera de los restos 318 (Glu), 320 (Lys) y 322 (Lys) a Ala.

Además, realizando mutaciones en estos restos, se ha mostrado que la unión de C1q se conserva siempre que el resto 318 tenga una cadena lateral de unión a hidrógeno y los restos 320 y 322 tengan ambos una cadena lateral cargada positiva.

La actividad de unión a C1q puede suprimirse reemplazando uno cualquiera de los tres restos específicos con un resto que tenga una funcionalidad inapropiada en su cadena lateral. No es necesario reemplazar los restos iónicos solamente con Ala para suprimir la unión de C1q. También es posible usar otros restos no iónicos sustituidos con alquilo, tales como Gly, Ile, Leu, o Val, o tales restos no polares aromáticos como Phe, Tyr, Trp y Pro en vez de uno cualquiera de los tres restos para suprimir la unión de C1q. Además, también es posible usar tales restos no iónicos polares como Ser, Thr, Cys y Met en lugar de los restos 320 y 322, pero no 318, para suprimir la actividad de unión a C1q.

También se observa que las cadenas laterales en restos polares iónicos o no iónicos serán capaces de formar enlaces de hidrógeno de una manera similar a los enlaces formados por el resto Glu. Por lo tanto, el reemplazo del

resto 318 (Glu) por un resto polar puede modificar pero no suprimir la actividad de unión a Clq.

También se conoce que el reemplazo del resto 297 (Asn) con Ala da como resultado retirada de la actividad lítica mientras que se reduce solo ligeramente (aproximadamente tres veces más débil) la afinidad por Clq. Esta alteración destruye el sitio de glucosilación y la presencia de carbohidratos que se requiere para activación del complemento.

5 Cualquier otra sustitución en este sitio también destruirá el sitio de glucosilación.

La invención también proporciona un anticuerpo que tiene una función efectora alterada en la que el anticuerpo tiene una región bisagra modificada. La región bisagra modificada puede comprender una región bisagra completa derivada de un anticuerpo de diferente clase o subclase de anticuerpos de la del dominio CH1. Por ejemplo, el dominio constante (CH1) de un anticuerpo de clase IgG puede unirse a una región bisagra de una clase de anticuerpo IgG4. Como alternativa, la nueva región bisagra puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad repetida en la que cada unidad en la repetición deriva de una región bisagra natural. En un ejemplo, la región bisagra natural se altera convirtiendo uno o más restos de cisteína en un resto neutro, tal como alanina, o convirtiendo restos situados de forma adecuada en restos de cisteína. Tales alteraciones se llevan a cabo usando química proteica reconocida en la técnica y, preferentemente, técnicas de ingeniería genética, como se describe en el presente documento.

10 En una realización de la invención, el número de restos de cisteína en la región bisagra del anticuerpo se reduce, por ejemplo, a un resto de cisteína. Esta modificación tiene la ventaja de facilitar el ensamblaje del anticuerpo, por ejemplo, moléculas de anticuerpo biespecíficas y moléculas de anticuerpo en las que la parte Fc se ha reemplazando por una molécula efectora o indicadora, puesto que solo es necesario formar un enlace disulfuro sencillo. Esta modificación también proporciona una diana específica para unir la región bisagra a otra región bisagra o a una molécula efectora o indicadora, directa o indirectamente, por ejemplo, por medios químicos.

20 Por el contrario, el número de restos de cisteína en la región bisagra del anticuerpo aumenta, por ejemplo, en al menos uno más que el número de restos de cisteína que aparecen normalmente. El aumento del número de restos de cisteína puede usarse para estabilizar las interacciones entre bisagras adyacentes. Otra ventaja de esta modificación es que facilita el uso de grupos tiol de cisteína para unir moléculas efectoras o indicadoras al anticuerpo alterado, por ejemplo, un radiomarcador.

25 En consecuencia, la invención posibilita un intercambio de regiones bisagra entre clases de anticuerpo, en particular, clases de IgG y/o un aumento o reducción del número de restos de cisteína en la región bisagra para conseguir una función efectora alterada (véase por ejemplo Patente de Estados Unidos N° 5.677.425). Se realiza una determinación de función efectora del anticuerpo alterado usando los ensayos descritos en el presente documento u otras técnicas reconocidas en la materia.

30 Resulta importante que el anticuerpo resultante puede someterse a uno o más ensayos para evaluar cualquier cambio en la actividad biológica en comparación con el anticuerpo de partida. Por ejemplo, la capacidad del anticuerpo con una región Fc alterada para unirse a complemento o receptores de Fc puede evaluarse usando los ensayos desvelados en el presente documento así como cualquier ensayo reconocido en la técnica.

35 Se lleva a cabo producción de los anticuerpos de la invención por cualquier técnica adecuada incluyendo técnicas descritas en el presente documento así como técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo una secuencia proteica apropiada, por ejemplo que forma parte de o todo un dominio constante relevante, por ejemplo, región Fc, es decir, dominio o dominios CH2 y/o CH3, de un anticuerpo, e incluye resto o restos alterados de forma apropiada puede sintetizarse y después unirse químicamente en el lugar apropiado en una molécula de anticuerpo.

40 Preferentemente, se usan técnicas de ingeniería genética para producir un anticuerpo alterado. Las técnicas preferidas incluyen, por ejemplo, preparar cebadores adecuados para su uso en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de modo que una secuencia de ADN que codifica al menos parte de una cadena pesada de IgG, por ejemplo, una región constante o Fc (por ejemplo, CH2 y/o CH3) está alterada, en uno o más restos. El segmento puede después ligarse operativamente a la parte restante del anticuerpo, por ejemplo, la región variable del anticuerpo y elementos reguladores requeridos para expresión en una célula.

45 La presente invención también incluye vectores usados para transformar la línea celular, vectores usados en la producción de los vectores transformantes, líneas celulares transformadas con los vectores transformantes, líneas celulares transformadas con vectores preparatorios, y procedimientos para su producción.

50 Preferentemente, la línea celular que se transforma para producir el anticuerpo con una región Fc alterada (es decir, de función efectora alterada) es una línea celular de mamífero inmortalizada (por ejemplo, célula CHO).

Aunque la línea celular usada para producir el anticuerpo con una región Fc alterada es preferentemente una línea celular de mamífero, puede usarse de forma alternativa cualquier otra línea celular adecuada, tal como una línea celular bacteriana o una línea celular de levadura.

55

11. Maduración de afinidad

Los anticuerpos (por ejemplo anticuerpos humanizados) de la invención pueden modificarse para función mejorada usando cualquiera de varias técnicas de maduración de afinidad. Normalmente, una molécula candidata con una afinidad de unión por una molécula diana dada se identifica y después se mejora adicionalmente o “madura” usando técnicas de mutagénesis que dan como resultado uno o más candidatos relacionados que tienen una interacción de unión más deseada con la molécula diana. Normalmente, es la afinidad del anticuerpo (o aidez, es decir, las afinidades combinadas del anticuerpo por un antígeno diana) lo que se modifica, sin embargo, también pueden modificarse otras propiedades de la molécula tales como estabilidad, función efectora, eliminación, secreción o función de transporte, de forma separada o en paralelo con la afinidad, usando técnicas de maduración de afinidad.

En realizaciones a modo de ejemplo, la afinidad de un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo humanizado de la presente invención) aumenta. Por ejemplo, los anticuerpos que tienen afinidades de unión de al menos $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$ o $10^9 M^{-1}$ pueden madurarse de modo que sus afinidades sean al menos $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$ o $10^{12} M^{-1}$.

Un enfoque para maduración de afinidad de una molécula de unión es sintetizar un ácido nucleico que codifica la molécula de unión, o parte de la misma, que codifica el cambio o cambios deseados. La síntesis de oligonucleótidos se conoce bien en la técnica y se automatiza fácilmente para producir uno o más ácido nucleicos que tengan cambio o cambios de codones deseados. Pueden introducirse también sitios de restricción, mutaciones silenciosas y uso de codón favorable de esta manera. Como alternativa, pueden alterarse uno o más codones para representar un subconjunto de aminoácidos particulares, por ejemplo, un subconjunto que excluya cisteínas que puedan formar engarces de disulfuro y se limita a una región definida, por ejemplo, una región CDR o parte de la misma. Como alternativa, la región puede representarse por un conjunto parcialmente o completamente aleatorio de aminoácidos (para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.830.650; 5.798.208; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.723.323; 4.528.266; 4.359.53; 5.840.479; y 5.869.644).

Se entiende que los enfoques anteriores pueden llevarse a cabo en parte o completamente usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se conoce bien en la técnica y tiene la ventaja de incorporar oligonucleótidos, por ejemplo, cebadores o ácidos nucleicos monocatenarios que tienen, por ejemplo, una alteración o alteraciones deseadas, en un ácido nucleico bicatenario y en cantidades amplificadas adecuadas para otras manipulaciones, tales como ingeniería genética en un vector de expresión o clonación apropiado. Dicha PCR también puede llevarse a cabo en condiciones que permitan la incorporación errónea de nucleótidos para introducir de este modo variabilidad adicional en los ácidos nucleicos que se amplifican. Pueden encontrarse detalles experimentales para llevar a cabo PCR y kits relacionados, reactivos y diseño de cebadores, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.202; 4.683.195; 6.040.166; y 6.096.551. Se describen procedimientos para introducir regiones CDR en regiones flanqueantes de anticuerpo usando PCR basada en cebadores en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.858.725. Se describen procedimientos para amplificación por PCR basada en cebadores de bibliotecas de anticuerpos (y bibliotecas realizadas de acuerdo con el procedimiento) empleando un conjunto mínimo de cebadores capaces de encontrar homología de secuencia con un conjunto más grande de moléculas de anticuerpo, de modo que puede amplificarse eficazmente un conjunto mayor y diverso de moléculas de anticuerpo, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.780.225; 6.303.313; y 6.479.243. También pueden usarse procedimientos no basados en PCR para realizar mutagénesis dirigida e incluyen mutagénesis “Kunkel” que emplea moldes que contienen uracilo bicatenarios y cebadores que hibridan e introducen una mutación cuando se pasan a través de una cepa particular de *E. coli* (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.873.192).

Los procedimientos adicionales para variar una secuencia de anticuerpos, o parte de la misma, incluyen síntesis de ácido nucleico o PCR de ácidos nucleicos en condiciones no óptimas (es decir, propensas a errores), desnaturalización y renaturalización (hibridación) de tales ácidos nucleicos, digestión por exonucleasa y/o endonucleasa seguido de reensamblaje por ligación o PCR (combinación de ácido nucleico), o una combinación de una o más de las técnicas anteriores como se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.440.668; 6.238.884; 6.171.820; 5.965.408; 6.361.974; 6.358.709; 6.352.842; 4.888.286; 6.337.186; 6.165.793; 6.132.970; 6.117.679; 5.830.721; y 5.605.793.

En cierta realización, las bibliotecas de anticuerpos (o bibliotecas de maduración de afinidad) que comprenden una familia de moléculas de anticuerpo candidatas que tienen diversidad en ciertas partes de la molécula de anticuerpo candidata, por ejemplo, en una o más regiones CDR (o una parte de las mismas), una o más regiones flanqueantes y/o una o más regiones constantes (por ejemplo, una región constante que tiene función efectora) pueden expresarse y explorarse con respecto a propiedades deseadas usando técnicas reconocidas en la materia (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.291.161; 6.291.160; 6.291.159; y 6.291.158). Por ejemplo, pueden construirse bibliotecas de expresión de dominios variables de anticuerpo que tengan una diversidad de secuencias de CDR3 y procedimientos para producir bibliotecas de anticuerpos humanos que tengan una diversidad de secuencias de CDR3 introduciendo, por mutagénesis, una diversidad de secuencias de CDR3 y recuperando la biblioteca (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.248.516).

Finalmente, para expresar los anticuerpos con afinidad madurada, los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de anticuerpo candidatas pueden introducirse en células en un formato de expresión apropiado, por ejemplo, como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, IgG), fragmentos Fab de anticuerpo

(por ejemplo, Fab, F(ab')₂) o como anticuerpos de cadena sencilla (scFv) usando tecnologías convencionales de vector y transfección/transformación de células (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.331.415; 6.103.889; 5.260.203; 5.258.498; y 4.946.778).

B. Ácido nucleico que codifica agentes inmunológicos y terapéuticos

5 También pueden inducirse respuestas inmunes frente a depósitos amiloides por administración de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y sus cadenas componentes usadas para inmunización pasiva. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno se liga normalmente a elementos reguladores, tales como un promotor y potenciador, que permite la expresión del segmento de ADN en las células diana pretendidas de un paciente. Para expresión en células sanguíneas, como es deseable para inducción de la respuesta inmune, los elementos promotores y potenciadores a modo de ejemplo incluyen los de genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada y/o el potenciador y promotor temprano intermedio principal de CMV (Stinski, Patente de Estados Unidos N° 5.168.062 y 5.385.839). Los elementos reguladores ligados y las secuencias codificantes se clonan con frecuencia en un vector. Para administración de anticuerpos de doble cadena, las dos cadenas pueden clonarse en el mismo vector o vectores preparados.

15 Están disponibles varios sistemas de vectores virales incluyendo sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109 (1993)); vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett y col., J. Virol. 67:5911 (1993)); vectores de virus adenoasociados (véase, por ejemplo, Zhou y col., J. Exp. Med. 179:1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela incluyendo virus vaccinia y los virus de viruela aviar, vectores virales del género de virus alfa tales como los derivados de Virus Sindbis y del Bosque de Semliki (véase, por ejemplo, Dubensky y col., J. Virol. 70:508 (1996)), virus de la encefalitis equina Venezolana (véase Johnston y col., documento US 5.643.576) y rhabdovirus, tales como virus de la estomatitis vesicular (véase Rose, documento 6.168.943) y papilomavirus (Ohe y col., Human Gene Therapy 6:325 (1995); Woo y col., documento WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

25 Puede empaquetarse ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que lo contiene, en liposomas. Se describen lípidos adecuados y análogos relacionados en Eppstein y col., documento US 5.208.036, Felgner y col., documento US 5.264.618, Rose, documento US 5.279.833 y Eband y col., documento US 5.283.185. Los vectores y ADN que codifican un inmunógeno también pueden adsorberse en o asociarse con vehículos en partículas, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de polimetil metacrilato y polilactidas y poli (lactida-co-glicolidas), véase, por ejemplo, McGee y col., J. Micro Encap. (1996).

30 Pueden suministrarse vectores de terapia génica o polipéptidos desnudos (por ejemplo, ADN) *in vivo* por administración a un paciente individual, normalmente por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o infusión intracraneal) o aplicación tópica (véase por ejemplo, Anderson y col., documento US 5.399.346). La expresión "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no suministrado en asociación con un agente facilitador de la transfección. Los polinucleótidos desnudos se clonan en ocasiones en un vector plasmídico. Tales vectores pueden incluir adicionalmente agentes facilitadores tales como bupivacaina (Weiner y col., documento US 5.593.972). También puede administrarse ADN usando una pistola génica. Véase Xiao & Brandsma, mencionada anteriormente. El ADN que codifica un inmunógeno se precipita en la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas helio en expansión, y penetran tejidos a una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, el Dispositivo de Suministro Génico AccelTM fabricado por Agricetus, Inc. Middleton WI es adecuado. Como alternativa, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel al torrente sanguíneo simplemente aplicando puntualmente el ADN en la piel con irritación química o mecánica (véase Howell y col., documento WO 95/05853).

45 En una variación adicional, los vectores que codifican inmunógenos pueden suministrarse a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia tisular) o células madre hematopoyéticas de donante universal, seguido de reimplantación de las células en un paciente, habitualmente después de selección con respecto a células que se han incorporado al vector.

II. Procedimientos profilácticos y terapéuticos

50 La presente divulgación se dirige entre otros al tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas por administración de reactivos inmunológicos terapéuticos (por ejemplo, inmunoglobulinas 12A11 inmunizadas) a epítopos específicos dentro de Aβ a un paciente en condiciones que generan una respuesta terapéutica beneficiosa en un paciente (por ejemplo inducción de fagocitosis de Aβ, reducción de carga de placas, inhibición de formación de placas, reducción de distrofia neurítica, mejora de la función cognitiva y/o inversión, tratamiento o prevención de deterioro cognitivo) en el paciente, por ejemplo, para la prevención o tratamiento de una enfermedad amiloidogénica. La invención también se refiere al uso de los reactivos inmunológicos desvelados (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad amiloidogénica.

En un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para prevenir o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloides de Aβ en el cerebro de un paciente. Tales enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer,

síndrome de Down y deterioro cognitivo. Este último puede producirse con o sin otras características de una enfermedad amiloidogénica. Tales procedimientos de la divulgación comprenden administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un componente de un depósito amiloide al paciente. Tales procedimientos son particularmente útiles para prevenir o tratar enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos.

5 Los procedimientos a modo de ejemplo comprenden administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une a $A\beta$. Los procedimientos preferidos comprenden administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-10 de $A\beta$, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-3 de $A\beta$, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-4 de $A\beta$, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-5 de $A\beta$, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-6 de $A\beta$, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-7 de $A\beta$ o anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 3-7 de $A\beta$. En otro aspecto más, la divulgación presenta administración de anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende un resto N-terminal libre de $A\beta$. En otro aspecto más, la divulgación presenta administración de anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de los restos de 1-10 de $A\beta$ en los que el resto 1 y/o resto 7 de $A\beta$ es ácido aspártico. En otro aspecto más, la divulgación presenta administración de anticuerpos que se unen específicamente a péptido $A\beta$ sin unión a proteína precursora amiloide de longitud completa (APP). En otro aspecto más, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano.

En otro aspecto más, la divulgación presenta administración de anticuerpos que se unen a un depósito amiloide en el paciente e inducen una respuesta de eliminación contra el depósito amiloide. Por ejemplo, una respuesta de eliminación tal puede efectuarse por fagocitosis mediada por receptor de Fc.

Los agentes terapéuticos de la invención están normalmente sustancialmente puros de contaminantes no deseados. Esto significa que un agente es normalmente al menos aproximadamente el 50 % p/p (peso/peso) puro, así como sustancialmente sin proteínas y contaminantes de interferencia. En ocasiones los agentes son al menos aproximadamente el 80 % p/p y, más preferentemente al menos el 90 o aproximadamente el 95 % p/p puros. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, pueden obtenerse péptidos homogéneos al menos el 99 % p/p puros.

Los procedimientos pueden usarse tanto en pacientes asintomáticos como en los que muestran actualmente síntomas de la enfermedad. Los anticuerpos usados en tales procedimientos pueden ser anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o no humanos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) y pueden ser monoclonales o policlonales, como se describe en el presente documento. En otro aspecto más, la invención presenta administración de anticuerpos preparados a partir de un ser humano inmunizado con péptido $A\beta$, pudiendo ser dicho ser humano el paciente que va a tratarse con anticuerpo.

En otro aspecto, la divulgación presenta administración de un anticuerpo con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse a un paciente administrando un polinucleótido que codifica al menos una cadena del anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y ligeras en el paciente. En realizaciones a modo de ejemplo, el paciente se controla con respecto a nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

La invención cumple de este modo una necesidad prolongada de regímenes terapéuticos para prevenir o aliviar la neuropatía y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado con enfermedad de Alzheimer.

A. Pacientes susceptibles de tratamiento

Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas, así como pacientes que muestran síntomas en la actualidad. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquier persona está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive el tiempo suficiente.

45 Por lo tanto, los presentes procedimientos pueden administrarse de forma profiláctica a la población general sin la necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente objeto. Los presentes procedimientos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de la enfermedad de Alzheimer. Tales individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen de APP, particularmente mutaciones en las posiciones 717 y posiciones 670 y 671 denominadas las mutaciones Hardy y Swedish respectivamente (véase Hardy, mencionado anteriormente). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historial familiar de AD, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que padecen en la actualidad la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por demencia característica, así como la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varios ensayos de diagnóstico para identificar individuos que tienen AD. Estos incluyen medición de los niveles de CSF tau y $A\beta_{42}$. Los niveles de tau elevados y de $A\beta_{42}$ reducidos indican la presencia de AD. Los individuos que padecen enfermedad de Alzheimer pueden diagnosticarse por criterios ADRDA como se analizan en la sección de ejemplos.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Habitualmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza los 40, 50, 60 o 70. El tratamiento normalmente implica múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede controlarse ensayando los niveles de anticuerpos a lo largo del tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosificación de refuerzo. En el caso de pacientes con síndrome de Down potenciales, el tratamiento puede comenzar en el periodo prenatal administrando agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

B. Regímenes de tratamiento y dosificaciones

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible de, o de otro modo en riesgo de, enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retardar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones o medicamentos a un paciente sospechoso de, o que ya padece, una enfermedad tal en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

En algunas realizaciones, la administración de agente reduce o elimina el deterioro miocognitivo en pacientes que aún no han desarrollado patología de Alzheimer característica. Una cantidad adecuada para conseguir tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis eficaz de forma terapéutica o profiláctica. En regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, se administran habitualmente agentes en varias dosificaciones hasta que se ha conseguido una respuesta inmune suficiente. La expresión "respuesta inmune" o "respuesta inmunológica" incluye el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) y/o una respuesta celular (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción) contra un antígeno en un sujeto receptor. Una respuesta tal puede ser una respuesta activa, es decir, inducida por administración de inmunógeno, o una respuesta pasiva, es decir inducida por administración de inmunoglobulina o anticuerpo o linfocitos T sensibilizados. Normalmente, la respuesta inmune se controla y se proporcionan dosificaciones repetidas si la respuesta inmune comienza a decaer.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medio de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Se necesita valorar las dosificaciones de tratamiento para optimizar la seguridad y eficacia.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. En otro ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0,5 mg/kg de peso corporal o 15 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 0,5-15 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la invención. Puede administrarse a los sujetos tales dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento a modo de ejemplo implica administración en múltiples dosificaciones durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos 6 meses. Los regímenes de tratamiento a modo de ejemplo adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación a modo de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos procedimientos, se administran dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión de forma simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado queda dentro de los intervalos indicados.

Se administra habitualmente anticuerpo en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones sencillas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique por medición de los niveles en sangre de anticuerpo para Aβ en sangre en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1.000 µg/ml y en algunos procedimientos 25-300 µg/ml. Como alternativa, puede administrarse anticuerpo como una formulación de liberación prolongada, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y secuencia varían dependiendo de la semi-vida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semi-vida más larga, seguido de anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos.

La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos a un paciente de que no esté ya en el estado estacionario para potenciar la resistencia del paciente. Se define que una cantidad tal es una "dosis profiláctica eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y la inmunidad general, pero generalmente varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente 0,5 a 2,5 mg por dosis. Se administra una dosificación relativamente baja a intervalos

relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas.

5 En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 200 mg de anticuerpo por dosis, usándose más habitualmente dosificaciones de 5 a 25 mg) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad y preferentemente hasta que el paciente muestra alivio parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. A continuación, puede administrarse un régimen profiláctico al paciente.

10 Las dosis para ácidos nucleicos que codifican anticuerpos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 ng, 1 µg a 10 mg o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.

15 Pueden administrarse agentes terapéuticos por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía más típica de administración de un agente inmunogénico es subcutánea aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más normalmente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos procedimientos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. Se prefiere inyección intramuscular o inyección intravenosa para administración de anticuerpo. En algunos procedimientos, los anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos procedimientos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación prolongada, tal como un dispositivo Medipad™.

20 Los agentes de la invención pueden opcionalmente administrarse en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de enfermedad amiloidogénica. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado de la invención (12A11 humanizado) se administra en combinación con un segundo agente inmunogénico o inmunológico. Por ejemplo, un anticuerpo 12A11 inmunizado de la invención puede administrarse en combinación con otro anticuerpo humanizado para Aβ. En otras realizaciones, se administra un anticuerpo 12A11 humanizado a un paciente que ha recibido o está recibiendo una vacuna de Aβ. En el caso de Alzheimer y síndrome de Down, en los que aparecen depósitos amiloides en el cerebro, los agentes de la invención también pueden administrarse junto con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera hematoencefálica. También pueden administrarse agentes de la invención en combinación con otros agentes que potencian el acceso del agente terapéutico a una célula o tejido diana, por ejemplo, liposomas y similares. La co-administración de tales agentes puede reducir la dosificación de un agente terapéutico (por ejemplo, anticuerpo terapéutico o cadena de anticuerpos), necesario para conseguir un efecto deseado.

C. Composiciones farmacéuticas

35 Los agentes de la invención se administran con frecuencia como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una diversidad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase, Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)). La forma preferida depende del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos habitualmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona de modo que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede también incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

45 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas metabolizadas lentamente grandes tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosán, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como Sepharose (TM) funcionalizado con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden actuar como agentes inmunoestimuladores (es decir, adyuvantes).

50 Para administración parenteral, los agentes de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes de pH y similares. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y de aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Pueden administrarse anticuerpos en forma de una inyección de depósito o preparación de implante, que puede formularse de tal manera que permita una liberación prolongada del principio activo. Una composición a modo de ejemplo comprende anticuerpo monoclonal a

5 mg/ml, formulada en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

Normalmente, se preparan composiciones como inyectables, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micro partículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para el efecto adyuvante potenciado, como se ha analizado anteriormente (véase Langer, *Science* 249: 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97 (1997)). Los agentes de la presente invención pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante, que puede formularse de tal manera que permitan una liberación prolongada o pulsátil del principio activo.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezcla que contiene el principio activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferentemente del 1 %-2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación prolongada o polvos y contienen el 10 %-95 % de principio activo, preferentemente el 25 %-70 %.

La aplicación tópica puede dar como resultado suministro transdérmico o intradérmico. La administración tópica puede facilitarse por co-administración del agente con toxina del cólera o derivados detoxificados o subunidades de las mismas u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). La co-administración puede conseguirse usando los componentes como una mezcla o como moléculas ligadas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

Como alternativa, puede conseguirse suministro transdérmico usando un parche cutáneo o usando transferosomas (Pauly col., *Eur. J. Immunol.* 25: 3521 (1995); Cevc y col., *Biochem. Biophys. Acta* 1368: 201-15 (1998)).

D. Control del ciclo de tratamiento.

La invención proporciona procedimientos para controlar el tratamiento en un paciente que padece o es susceptible de Alzheimer, es decir, para controlar un ciclo de tratamiento que se administra a un paciente. Los procedimientos pueden usarse para controlar tanto tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. En particular, los procedimientos son útiles para controlar la inmunización pasiva (por ejemplo, medir el nivel de anticuerpo administrado).

Algunos procedimientos implican determinar un valor de línea basal, por ejemplo, de un nivel de anticuerpo o perfil en un paciente, antes de administrar una dosificación de agente y comparar éste con un valor para el perfil o nivel después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas del mismo ejemplo, expresado como una desviación típica de la media de tales mediciones) en el valor del nivel o perfil señala un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha conseguido una respuesta deseada). Si el valor para respuesta inmune no cambia significativamente, o se reduce, se indica un resultado totalmente negativo.

En otros procedimientos, se determina un valor de control (es decir, una media y desviación típica) del nivel o perfil para una población de control. Normalmente los individuos en la población de control no han recibido tratamiento anterior. Los valores medidos del nivel o perfil en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan después con el valor de control. Un aumento significativo en relación con el valor de control (por ejemplo, mayor de una desviación típica de la media) señala un resultado de tratamiento suficiente o positivo. Una falta de aumento o una reducción significativa señala un resultado de tratamiento insuficiente o negativo. La administración de agente generalmente se continúa mientras el nivel está aumentando en relación con el valor del control. Como antes, la consecución de una meseta en relación con los valores del control es un indicador de que la administración del tratamiento puede detenerse o reducirse en dosificación y/o frecuencia.

En otros procedimientos, se determina un valor de control del nivel o perfil (por ejemplo, una media y desviación típica) a partir de una población de control de individuos que han experimentado tratamiento con un agente terapéutico y cuyos niveles o perfiles han llegado a una meseta en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de los niveles o perfiles en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación típica) del valor de control, el tratamiento puede detenerse. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, se garantiza la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces puede indicarse un cambio de tratamiento.

En otros procedimientos, un paciente que no está recibiendo actualmente tratamiento pero ha experimentado un ciclo previo de tratamiento se controla con respecto a niveles de anticuerpo o perfiles para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El nivel medido o perfil en el paciente puede compararse con un valor previamente conseguido en el paciente después de un ciclo de tratamiento anterior. Una reducción significativa en relación con la

medición previa (es decir, mayor que un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es un indicio de que el tratamiento puede reanudarse. Como alternativa, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación típica) determinado en una población de pacientes después de someterse a un ciclo de tratamiento. Como alternativa, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados de forma profiláctica que permanecen sin síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran alivio de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una reducción significativa en relación con el nivel de control (es decir, más de una desviación típica) es un indicio de que el tratamiento debería reanudarse en un paciente.

La muestra tisular para análisis es normalmente sangre, plasma, suero, fluido mucoso o fluido cerebroespinal del paciente. La muestra se analiza, por ejemplo, con respecto a niveles o perfiles de anticuerpos para péptido Aβ, por ejemplo, niveles o perfiles de anticuerpos humanizados. Los procedimientos de ELISA para detectar anticuerpos específicos para Aβ se describen en la sección de Ejemplos. En algunos procedimientos, el nivel o perfil de un anticuerpo administrado se determina usando un ensayo de eliminación, por ejemplo, en un ensayo de fagocitosis *in vitro*, como se describe en el presente documento. En tales procedimientos, una muestra tisular de un paciente que se ensaya se pone en contacto con depósitos amiloides (por ejemplo, de un ratón PDAPP) y células fagocíticas que portan receptores de Fc. Se controla después la eliminación posterior del depósito amiloide. La existencia y alcance de la respuesta de eliminación proporciona un indicio de la existencia y nivel de anticuerpos eficaces para eliminar Aβ en la muestra tisular del paciente que se ensaya.

El perfil del anticuerpo después de la inmunización pasiva normalmente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpo seguido de una desintegración exponencial. Sin una dosificación adicional, la desintegración se acerca a niveles de pretratamiento en un período de días a meses dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado.

En algunos procedimientos, se realiza una medición de línea basal de anticuerpo para Aβ en el paciente antes de la administración, se realiza una segunda medición poco después para determinar el nivel de anticuerpo pico, y se realiza una o más mediciones adicionales a intervalos para controlar la desintegración de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo se ha reducido a la línea basal o a un porcentaje predeterminado de la línea basal sin pico (por ejemplo, 50 %, 25 % o 10 %), se realiza la administración de una dosificación adicional de anticuerpo. En algunos procedimientos, el pico o los niveles medidos posteriormente menos el fondo se comparan con niveles de referencia que se ha determinado previamente que constituyen un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico beneficioso en otros pacientes. Si el nivel de anticuerpo medido es significativamente menor que un nivel de referencia (por ejemplo, menor de la media menos una desviación típica del valor de referencia en población de pacientes que se benefician del tratamiento) se indica la administración de una dosificación adicional del anticuerpo.

Los procedimientos adicionales incluyen control, durante el ciclo de tratamiento, de cualquier síntoma fisiológico reconocido en la técnica (por ejemplo, síntoma físico o mental) en el que rutinariamente se basan los investigadores o médicos para diagnosticar o controlar enfermedades amiloidogénicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Por ejemplo, se puede controlar el deterioro cognitivo. Este último es un síntoma de la enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down pero también puede aparecer con otras características de una de estas enfermedades. Por ejemplo, el deterioro cognitivo puede controlarse determinando la puntuación de un paciente en el Mini Examen de Estado Mental de acuerdo con la convención a lo largo del ciclo de tratamiento.

La presente invención se describirá de forma más completa por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Se usan los siguientes identificadores de secuencia en toda la sección de Ejemplos para hacer referencia a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de región variable de cadena de inmunoglobulina.

Anticuerpo	Secuencia de nucleótidos de VL	Secuencia de aminoácidos de VL	Secuencia de nucleótidos de VH	Secuencia de aminoácidos de VH
12A11	SEC ID N°: 1 (codificante)	SEC ID N°: 2	SEC ID N°: 3 (codificante)	SEC ID N°: 4
12A11v1	SEC ID N°: 34	SEC ID N°: 7	SEC ID N°: 35	SEC ID N°: 10
1211v2		SEC ID N°: 7		SEC ID N°: 13
12A11v2.1		SEC ID N°: 7		SEC ID N°: 14
12A11v3		SEC ID N°: 7		SEC ID N°: 15
12A11	SEC ID N° 5		SEC ID N°: 6	

Como se usa en el presente documento, una secuencia de anticuerpo o inmunoglobulina que comprende una secuencia VL y/o VH como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 1-4 puede comprender la secuencia completa o pueden comprender la secuencia madura (es decir, péptido maduro sin el péptido señal o líder).

Estudios anteriores han mostrado que es posible predecir la eficacia *in vivo* de diversos anticuerpos Aβ en la reducción de neuropatología asociada con AD (por ejemplo, carga de placa) por la capacidad de los anticuerpos para unirse a placas *ex vivo* (por ejemplo, en secciones de cerebro AD o PDAPP) y/o desencadenar eliminación de placa en un ensayo de fagocitosis *ex vivo* (Bard y col. (2000) Nat. med. 6: 916-919). La correlación apoya la noción de que la fagocitosis dependiente de Fc por células microgliales y/o macrófagos es importante para el proceso de eliminación de placa *in vivo*. Sin embargo, también se ha indicado que la eficacia del anticuerpo puede obtenerse además *in vivo* por mecanismos que son independientes de interacciones de Fc (Bacskai y col. (2002) J. Neurosci. 22: 7873-7878). Los estudios han indicado que un anticuerpo dirigido contra la parte media de Aβ, que no puede reconocer placas amiloides, parece unirse a Aβ soluble y reducir la deposición de placas (DeMattos y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 8850-8855).

Para caracterizar la eficacia *in vivo* potencial del anticuerpo monoclonal murino 12A11 (isotipo IgG1), se realizaron en primer lugar diversos ensayos *ex vivo*.

Avidez de mAb 12A11 por Aβ1-42. La unión del anticuerpo monoclonal 12A11 con Aβ1-42 sintético agregado se realizó por ELISA, como se describe en Schenk, y col. (Nature 400: 173 (1999)). Para fines de comparación, también se ensayaron los mAb 12B4 y 10D5. Aβ1-42 soluble se refiere al péptido Aβ1-42 sintético sonicado en dimetil sulfóxido (DMSO). Se incubaron diluciones seriadas de los anticuerpos a 20 µg/ml con 50.000 cpm de [¹²⁵I]Aβ1-42 (190 µCi/µmol; marcaje con reactivo Iodogen, Pierce) durante una noche a temperatura ambiente. Se incubaron cincuenta microlitros de una suspensión que contenía proteína A Sepharose 75 mg/ml (Amersham Pharmacia) y 200 µg de IgG de conejo anti-ratón (H+L) (Jackson ImmunoResearch) con los anticuerpos diluidos durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron dos veces y se contaron en un contador gamma Wallac (Perkin-Elmer). Todas las etapas se realizaron en tampón RIA que consistía en Tris 10 mM, NaCl 0,5 M, gelatina 1 mg/ml y Nonidet P-40 al 0,5 %, pH 8,0.

Los resultados del estudio de avidéz se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Anticuerpo	Epítipo	Isotipo	DE ₅₀ en Aβ1-A42 agregado, µM	% de captura de Aβ1-42 soluble
10D5 [†]	Aβ-37	IgG1	53	1
12B4 [†]	Aβ-37	IgG2a	667	8
12A11	Aβ-37	IgG1	233	30

[†]Los anticuerpos 10D5 y 12B4 se describen en detalle en el documento WO 02/46237 y la Solicitud de Patente Internacional N° de Serie PCT/US03/07715, respectivamente.

* Como una comparación, el anticuerpo 266 a 10 µg/ml capturaría el 70 % de Aβ1-42

Todos los anticuerpos ensayados mostraron una alta avidéz por Aβ1-42 agregado. Además, los anticuerpos 12B4 y 12A11 capturaron de forma apreciable Aβ1-42 soluble a concentraciones de anticuerpo de 20 µg/ml. Como se muestra en la Tabla 2, el anticuerpo de IgG1 12A11 capturó Aβ1-42 de manera más eficaz que el anticuerpo IgG2a 12B4 o el anticuerpo IgG1 10D5.

La capacidad de diversos anticuerpos (incluyendo 12A11) para capturar Aβ soluble se ensayó adicionalmente como sigue. Se incubaron diversas concentraciones de anticuerpo (hasta 10 µg/ml) con 50.000 CPM de ¹²⁵I-Aβ 1-42 (o ¹²⁵I-Aβ1-40). La concentración de anticuerpo suficiente para unirse al 25 % de las cuentas radiactivas se determinó en un radioinmunoensayo de captura. Para anticuerpos no capaces de unirse al 25 % de las cuentas a 10 µg/ml, se determinó el porcentaje de cuentas unidas a 10 µg/ml. El 12A11 se unió al 20 % de las cuentas radiactivas (es decir, ¹²⁵I-Aβ) a 10 µg/ml. Esto fue mayor que la cantidad unidad por otros dos anticuerpos de Aβ-3-7 ensayados, concretamente 12B4 y 10D5 (que se unen al 7 % y al 2 % a 10 µg/ml, respectivamente). Por lo tanto, de los anticuerpos N-terminales (epítipo Aβ3-7) ensayados, 12A11 mostró la capacidad más apreciable de capturar Aβ.

Como medida de su capacidad para desencadenar eliminación de placas mediada por Fc, los anticuerpos también se compararon en un ensayo de fagocitosis *ex vivo* con células microgliales de ratón primarias y secciones de tejido cerebral de ratones PDAPP. Se usaron anticuerpos IgG1 e IgG2a irrelevantes, que no tenían reactividad hacia Aβ u otros componentes del ensayo, como controles negativos de isotipo coincidente. Brevemente, se cultivaron células microgliales primarias murinas, con secciones de criostato no fijadas de cerebro de ratón PDAPP en presencia de anticuerpos. Después de 24 h de incubación, el nivel total de Aβ restante en los cultivos se midió por ELISA. Para

cuantificar el grado de eliminación de placa/degradación A β , se extrajo A β de los cultivos de microglía y secciones de cerebro ($n = 3$) con urea 8 M para análisis de ELISA. Los datos se analizaron con ANOVA seguido de un ensayo de Dunnett post hoc.

5 Como se muestra en la Figura 1, el anticuerpo 12B4 redujo los niveles de A β de forma eficaz (73 % para 12B4; $P < 0,001$) mostrando 12A11 algo menos, aunque estadísticamente significativo, de eficacia (48 % para 12A11, $P < 0,05$). El anticuerpo 10D5 no redujo significativamente los niveles de A β . El rendimiento de 12A11 en el ensayo de fagocitosis *ex vivo* puede mejorarse tras conversión al isotipo IgG2a que es un isotipo preferido para fagocitosis microglial.

Ejemplo II. Eficacia *in vivo* de anticuerpo 12A11 de ratón

10 *El anticuerpo 12A11 de ratón reduce la neuropatología de tipo Alzheimer in vivo.* Para determinar la eficacia *in vivo* de 12A11, se administraron anticuerpos (incluyendo 12A11, 12B4 o 10D5) a ratones a 10 mg/kg por inyección intraperitoneal semanal durante 6 meses como se describe en Bard y col. (2000) Nat. Med. 6: 916. Al final del estudio, los niveles totales de A β corticales se determinaron por ELISA. Como se muestra en la Figura 2A, cada uno de los anticuerpos redujo significativamente los niveles de A β totales en comparación con el control de PBS ($P < 0,001$), es decir, 12B4 mostró una reducción del 69 %, 10D5 mostró una reducción del 52 % y 12A11 mostró una reducción del 31 %.

15 El nivel de distrofia neurítica se examinó después en secciones de tejido cerebral de los ratones anteriormente mencionados para determinar la asociación entre eliminación de placa y protección neuronal. Se muestran datos de los análisis de imágenes cerebrales que examinaron el porcentaje de córtex frontal ocupado por distrofia neurítica en la Figura 2B. Estos datos muestran que los anticuerpos 10D5 y 12A11 no eran eficaces en la reducción de la distrofia neurítica mientras que 12B4 redujo significativamente la distrofia neurítica (12B4, $P < 0,05$; ANOVA seguido de ensayo de Dunnett post hoc), como se determinó por el ensayo descrito en el presente documento. De nuevo, esta actividad de 12A11 puede mejorarse convirtiendo 12A11 al isotipo IgG2a (eficacia murina). Con respecto a versiones humanizadas de 12A11, se prefieren isotipos IgG1 para reducir la distrofia neurítica.

20 También se describen experimentos que demuestran las propiedades de unión y eficacia *in vivo* del anticuerpo 12A11 en Bard, y col. PNAS 100:2023 (2003).

25 En resumen, todos los anticuerpos tuvieron avidez significativa por A β agregado y desencadenaron eliminación de placa en un ensayo *ex vivo*. El isotipo IgG2a (afinidad por receptor de Fc, en particular, Fc γ R1) parece ser un atributo importante tanto de eliminación de A β como de protección contra distrofia neurítica. El anticuerpo 12A11 (IgG1) capturó A β 1-42 monomérico soluble de forma más eficaz que 12B4 (IgG2a) o 10D5 (IgG1) pero no fue tan eficaz en la reducción de distrofia neurítica. Puede conseguirse eficacia mejorada en la reducción de carga de placas y reducción de distrofia neurítica obteniendo por ingeniería genética anticuerpos que tengan un isotipo que apoye al máximo la fagocitosis. Anticuerpos particularmente eficaces se unen a epítomos dentro del extremo N terminal de A β .

Ejemplo III. Clonación y secuenciación de las regiones variables de 12A11 de ratón

35 *Análisis de clonación y secuencia de 12A11 VH.* Las regiones VH y VL de 12A11 de células de hibridoma se clonaron por RT-PCR y 5' RACE usando ARNm de células de hibridoma y metodología de clonación convencional. La secuencia de nucleótidos (codificante, SEC ID N°: 3) y secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 4) derivaron de clones de ADNc independientes que codificaban el dominio VH de 12A11 supuesto, como se expone en la Tabla 3 y la Tabla 4, respectivamente.

40 Tabla 3: Secuencia de ADN de VH de 12A11 de ratón

ATGGACAGGCTTACTACTTCATTCCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCTT
 GTCCCAAGTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGAAGCCCTCACAG
 ACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTAT
 GAGTGTAGGCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGC
 ACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGG
 CTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTATTCCTCAAGATCACCA
 GTGTGGACACTGCAGATACTGCCACTTACTACTGTGCTCGAAGA ACTACTAC
 GGCTGACTACTTTGCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEQ ID N°: 3)

Tabla 4: Secuencia de aminoácidos de VH de 12A11 de ratón

mdrlttsfllivpayvlsQVTLKESGPGILKPSQTLTLTCSFSGFSLStsgmsvgWIRQPSGKGLEWLAhiwwdddkyynpslksRLTIS
KDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARttttadyfayWGQGTTLTVSS (SEC ID N°: 4)

5 *Péptido líder y CDR en minúsculas.

Análisis de clonación y secuencia de 12A11 VL. La región VL variable de cadena ligera de 12A11 se clonó de una manera análoga a la región VH. La secuencia de nucleótidos (codificante, SEC ID N°: 1) y secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 2) derivadas de dos clones de ADNc independientes que codifican el dominio VL de 12A11 supuesto, se exponen en la Tabla 5 y la Tabla 6, respectivamente.

10 Tabla 5: Secuencia de ADN de VL 12A11 de ratón

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAG
CAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAG
ATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGG
AAACACCTACTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCT
CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGT
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT
GAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAAGTTCACATGTTCTCTCACGTT
CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEC ID N°: 1)

Tabla 6: Secuencia de aminoácidos de VL de 12A11 de ratón

15 mklpvrllvmfwpasssDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCrssqsvihvngntyleWYLQKPGQSPKLLIYkvsnrfsGVPDRFSGSG
SGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCfqsshvplfFGAGTKLELK (SEC ID N°: 2)

*Péptido líder y CDR en minúsculas.

20 Las secuencias VH y VL de 12A11 cumplen los criterios para regiones V funcionales siempre que contengan una ORF contigua desde la metionina de inicio a la región C y compartan restos conservados característicos de genes de región V de inmunoglobulina. De N-terminal a C-terminal, las cadenas tanto ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

Ejemplo IV: Expresión de anticuerpo 12A11 quimérico

25 *Expresión de anticuerpo 12A11 quimérico:* Las regiones de cadena pesada y ligera variables se modificaron de nuevo por ingeniería genética para codificar secuencias donadoras de corte y empalme cadena debajo de los puntos de unión VDJ o VJ respectivos, y se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pCMV-hγ1 para la cadena pesada y pCMV-hκ1 para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes γ1 y Cκ humanas como fragmentos exónicos cadena abajo del casete de región variable insertado. Después la verificación de secuencia, los vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera se co-transfectaron en células COS. Se co-transfectaron de forma independiente diversos clones de cadena pesada con diferentes clones de cadena ligera quiméricos para conformar la reproducibilidad del resultado. Los anticuerpos se inmunoprecipitaron del medio acondicionado para células COS usando proteína A Sepharose. Se detectaron cadenas de anticuerpo en inmunotransferencias de geles de SDS-PAGE. Se consiguió detección usando anticuerpo de cabra anti-IgG humano (H+L) a una dilución 1:5000 a temperatura ambiente durante 1 hora. Se detectaron cantidades significativas de cadena de 12A11 H+L en medio condicionado.

35 Se ensayó unión directa de anticuerpo 12A11 quimérico con Aβ por ensayo de ELISA. La Figura 4 demuestra que se descubrió que 12A11 quimérico se unía a Aβ con alta avidéz, similar a la demostrada por 3D6 quimérico y humanizado. (La clonación, caracterización y humanización de 3D6 se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 10/010.942). La avidéz de unión también fue similar a la demostrada por 12B4 quimérico y humanizo. (La clonación, caracterización y humanización de 12B4 se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 10/388.214).

Ejemplo V. Humanización de 12A11A. Anticuerpo humanizado 12A11, Versión 1

Análisis de modelo molecular/homología. Para identificar restos flanqueantes estructurales clave en el anticuerpo 12A11 murino, se estudiaron modelos tridimensionales para anticuerpos murinos resueltos que tenían homología con las cadenas pesada y ligera de 12A11. Se seleccionó un anticuerpo designado 1KTR que tenía homología cercana con la cadena ligera de 12A11 y se seleccionaron dos anticuerpos designados 1ETZ y 1JRH que tenían homología cercana con la cadena pesada de 12A11. Estos anticuerpos de ratón muestran fuerte conservación de secuencia con 12A11 (94 % de identidad en 112 aminoácidos para Vk y 83 % de identidad en 126 aminoácidos y 86 % de identidad en 121 aminoácidos respectivamente para Vh). La estructura de cadena pesada de 1ETZ se superpuso sobre la de 1KTR. Además, para Vk los bucles de CDR del anticuerpo seleccionado quedan en las mismas clases estructurales de Chothia canónicas que los bucles de CDR de 12A11 VL. Las estructuras cristalinas de estos anticuerpos se examinaron con respecto a restos (por ejemplo, restos FR importantes para conformación de CDR, etc.) que se predice que son importantes para la función del anticuerpo y, por comparación, la función del anticuerpo 12A11 similar.

Selección de secuencias de anticuerpo aceptor humano. Se identificaron secuencias de anticuerpo aceptor humano adecuadas por comparaciones por ordenador de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se realizó de forma separada para las cadenas pesada y ligera de 12A11. En particular, los dominios variables de anticuerpos humanos cuyas secuencias flanqueantes mostraron un alto grado de identidad de secuencia con las regiones flanqueantes de VL y VH murinas se identificaron por consulta de la Base de Datos de Ig de NCBI usando NCBI BLAST (públicamente accesible a través del servidor de Internet de NCBI de los Institutos Nacionales de Salud) con las secuencias flanqueantes murinas respectivas.

Se seleccionaron dos secuencias candidatas como secuencias aceptoras basándose en los siguientes criterios: (1) homología con la secuencia sujeto; (2) compartir estructuras de CDR canónicas con la secuencia donadora; y/o (3) no contener ningún resto aminoácido poco común en las regiones flanqueantes. La secuencia aceptor seleccionada para VL es BAC01733 en la base de datos no redundantes de Ig del NCBI. La secuencia aceptor seleccionada para VH es AAA69734 en la base de datos no redundante de Ig del NCBI. AAA69734 es un anticuerpo del subgrupo III humano (en lugar del subgrupo II) pero se seleccionó como un anticuerpo aceptor inicial basándose al menos en parte en el razonamiento de Saldanha y col. (1999) Mol. Immunol. 36: 709. Las primeras versiones de anticuerpo 12A11 humanizado usan estas secuencias de anticuerpo aceptor seleccionadas. El anticuerpo se describe en Schroeder y Wang (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6146.

Sustitución de restos aminoácidos. Como se ha observado anteriormente, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden regiones flanqueantes variables sustancialmente de una inmunoglobulina humana (inmunoglobulina aceptor) y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de una inmunoglobulina de ratón (inmunoglobulina donadora) denominada 12A11. Habiendo identificado las regiones determinantes de complementariedad de 12A11 e inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa fue determinar qué restos, si los hubiera, de estos componentes sustituir para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante.

Región V de cadena ligera remodelada:

El alineamiento de aminoácidos de la región V de cadena ligera remodelada se muestra en la Figura 5A. La selección del armazón aceptor (BAC01733) es del mismo subgrupo humano que el que corresponde a la región V murina, no tiene restos flanqueantes inusuales y las CDR pertenecen a los mismos grupos de estructura canónica de Chothia. No se realizaron retromutaciones en la Versión 1 de 12A11 humanizado.

Región V de cadena pesada remodelada:

El alineamiento de aminoácidos de la región V de cadena pesada remodelada se muestra en la Figura 5B. La selección del armazón aceptor (AAA69734) es del subgrupo III humano (como se ha descrito previamente) y no tiene restos flanqueantes poco habituales. El análisis estructural de la cadena VH murina (1ETZ y 1JRH), junto con el alineamiento de aminoácidos de AAA69734 con la secuencia murina dicta 9 retromutaciones en la versión (v1) y de la cadena pesada remodelada: A24F T28S F29L V37I V48L F67L R71K N73T L78V (numeración de Kabat). Las retromutaciones se destacan por asteriscos en el alineamiento de aminoácidos mostrado en la Figura 5B.

De las 9 retromutaciones, 3 están dictadas por el modelo debido a que los restos son restos canónicos (A24F, F29L, y R71K, relleno sólido), es decir, restos flanqueantes que pueden contribuir a la unión a antígeno en virtud de su proximidad a restos de CDR. Hay una retromutación en la siguiente clase más importante de restos, los restos de interfaz implicados en interacciones de empaquetamientos VH-VL (subrayado), es decir, V37I. La mutación N73T está en un resto de vernier (relleno discontinuo) en el borde del sitio de unión, que posiblemente interacciona con S30 adyacente a CDR1. Los 4 restos restantes diana de retromutación (T28S, V48L, F67L, L78V, numeración de Kabat) también quedan dentro de la clase vernier (contribución indirecta a conformación de CDR, relleno discontinuo en la Figura 5B).

ES 2 382 547 T3

Se presenta un sumario de los cambios incorporados en la versión 1 de 12A11 humanizado en la Tabla 7.

Tabla 7. Sumario de cambios en 12A11.v1

Cambios	VL (112 restos)	VH (120 restos)
Hu->Mu: Flanqueante	0/112	9/120
CDR1	5/16	6/7
CDR2	3/7	10/16
CDR3	6/8	8/11
Hu->Mu Total	14/112 (12,5 %)	33/120 (27,5 %)
Mu->Hu: Flanqueante	11/112	26/120
Notas de retromutación	ninguna	1. Canónico: A24F, F29L, R71K 2. Empaquetamiento: V37I3. 3. Vernier: T28S, V48L, F67L, N73T, L78V
Notas de aceptor	4. N° de acceso de Genbank BAC01733 7. 5. CDR del mismo grupo estructural canónico que el ratón donador 6. Cadena ligera kappa de inmunoglobulina kappa K64 (AIMS4)	7. N° de acceso de Genbank AAA69734 (H1-clase 1, H2 = clase 3) 8. CDR del mismo grupo estructural canónica 9. como ratón donador 9, Ig fetal

5 Las Tablas 8 y 9 exponen claves de numeración de Kabat para las diversas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Tabla 8: Clave para numeración de Kabat para la cadena ligera de 12A11

N° de KAB	N°	TIPO	12A11 VL de ratón	12A11 VL HUM	BAC 01733	A19-Línea germinal	Comentario
1	1	FR1	D	D	D	D	
2	2		V	V	V	I	<i>canónico</i>
3	3		L	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	<i>vernier</i>
5	5		T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	
7	7		T	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	
9	9		L	L	L	L	
10	10		S	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	
12	12		P	P	P	P	

ES 2 382 547 T3

(continuacion)

Nº de KAB	Nº	TIPO	12A11 VL de ratón	12A11 VL HUM	BAC 01733	A19-Línea germinal	Comentario
13	13		V	V	V	V	
14	14		S	T	T	T	
15	15		L	P	P	P	
16	16		G	G	G	G	
17	17		D	E	E	E	
18	18		Q	P	P	P	
19	19		A	A	A	A	
20	20		S	S	S	S	
21	21		I	I	I	I	
22	22		S	S	S	S	
23	23		C	C	C	C	
24	24	CDR1	R	R	R	R	
25	25		S	S	S	S	
26	26		S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	
27A	28		S	S	S	S	
27B	29		I	I	L	L	
27C	30		V	V	L	L	
27D	31		H	H	H	H	
27E	32		S	S	S	S	
28	33		N	N	N	N	
29	34		G	G	G	G	
30	35		N	N	Y	Y	
31	36		T	T	N	N	
32	37		Y	Y	Y	Y	
33	38		L	L	L	L	
34	39		E	E	D	D	
35	40	FR2	W	W	W	W	
36	41		Y	Y	Y	Y	<i>empaquetamiento</i>
37	42		L	L	L	L	
38	43		Q	Q	Q	Q	<i>empaquetamiento</i>
39	44		K	K	K	K	
40	45		P	P	P	P	<i>vernier</i>
41	46		G	G	G	G	

ES 2 382 547 T3

(continuacion)

Nº de KAB	Nº	TIPO	12A11 VL de ratón	12A11 VL HUM	BAC 01733	A19-Línea germinal	Comentario
42	47		Q	Q	Q	Q	
43	48		S	S	S	S	
44	49		P	P	P	P	<i>empaquetamiento</i>
45	50		K	Q	Q	Q	
46	51		L	L	L	L	<i>empaquetamiento</i>
47	52		L	L	L	L	<i>vernier</i>
48	53		I	I	I	I	<i>canónico</i>
49	54		Y	Y	Y	Y	<i>vernier</i>
50	55	CDR2	K	K	L	L	
51	56		V	V	G	G	
52	57		S	S	S	S	
53	58		N	N	N	N	
54	59		R	R	R	R	
55	60		F	F	A	A	
56	61		S	S	S	S	
57	62	FR3	G	G	G	G	
58	63		V	V	V	V	
59	64		P	P	P	P	
60	65		D	D	D	D	
61	66		R	R	R	R	
62	67		F	F	F	F	
63	68		S	S	S	S	
64	69		G	G	G	G	<i>canónico</i>
65	70		S	S	S	S	
66	71		G	G	G	G	<i>vernier</i>
67	72		S	S	S	S	
68	73		G	G	G	G	<i>vernier</i>
69	74		T	T	T	T	<i>vernier</i>
70	75		D	D	D	D	
71	76		F	F	F	F	<i>canónico</i>
72	77		T	T	T	T	
73	78		L	L	L	L	
74	79		K	K	K	K	

ES 2 382 547 T3

(continuacion)

Nº de KAB	Nº	TIPO	12A11 VL de ratón	12A11 VL HUM	BAC 01733	A19-Línea germinal	Comentario
75	80		I	I	I	I	
76	81		S	S	S	S	
77	82		R	R	R	R	
78	83		V	V	V	V	
79	84		E	E	E	E	
80	85		A	A	A	A	
81	86		E	E	E	E	
82	87		D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	
85	90		I	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	<i>empaquetamiento</i>
88	93		C	C	C	C	
89	94	CDR3	F	F	M	M	
90	95		Q	Q	Q	Q	
91	96		S	S	A	A	
92	97		S	S	L	L	
93	98		H	H	Q	Q	
94	99		V	V	T	T	
95	100		P	P	P	P	
96	101		L	L	Y		
97	102		T	T	T		
98	103	FR4	F	F	F		<i>empaquetamiento</i>
99	104		G	G	G		
100	105		A	Q	Q		
101	106		G	G	G		
102	107		T	T	T		
103	108		K	K	K		
104	109		L	L	L		
105	110		E	E	E		
106	111		L	I	I		
106A	112		K	K	K		

ES 2 382 547 T3

Tabla 9: Clave para numeración de kabat para la cadena pesada de 12A11

Nº KAB	Nº	TIPO	12A11 VH de ratón	12A11 VHv1 HUM	AAA 69734	567123 Línea germinal	Comentario
1	1	FR1	Q	Q	Q	Q	
2	2		V	V	V	V	<i>vernier</i>
3	3		T	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L	L	
5	5		K	V	V	V	
6	6		E	E	E	E	
7	7		S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	
9	9		P	G	G	G	
10	10		G	G	G	G	
11	11		I	V	V	V	
12	12		L	V	V	V	
13	13		K	Q	Q	Q	
14	14		P	P	P	P	
15	15		S	G	G	G	
16	16		Q	R	R	R	
17	17		T	S	S	S	
18	18		L	L	L	L	
19	19		S	R	R	R	
20	20		L	L	L	L	
21	21		T	S	S	S	
22	22		C	C	C	C	
23	23		S	A	A	A	
24	24		F	F	A	A	canónico para H1 - baclanutato en v1
25	25		S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	<i>canónico</i>
27	27		F	F	F	F	<i>canónico</i>
28	28		S	S	T	T	vernier, cercano a H1 - baclanutato en v1
29	29		L	L	F	F	canónico para H1 - baclanutato en v1
30	30		S	S	S	S	
31	31	CDR1	T	T	S	S	
32	32		S	S	Y	Y	

ES 2 382 547 T3

(continuación)

Nº KAB	Nº	TIPO	12A11 VH de ratón	12A11 VHv1 HUM	AAA 69734	567123 Línea germinal	Comentario
	33		G	G	A	A	
	34		M	M	M	M	
	35		S	S	H	H	
35A	36		V	V	-	-	
35B	37		G	G	-	-	
	36	FR2	W	W	W	W	
	37		I	I	V	V	empaquetamiento – retromutación en v1
	38		R	R	R	R	
	39		Q	Q	Q	Q	<i>empaquetamiento</i>
	40		P	A	A	A	
	41		S	P	P	P	
	42		G	G	G	G	
	43		K	K	K	K	
	44		G	G	G	G	
	45		L	L	L	L	<i>empaquetamiento</i>
	46		E	E	E	E	
	47		W	W	W	W	<i>empaquetamiento</i>
	48		L	L	V	V	vernier (debajo de H2) – retromutación en v1
	49		A	A	A	A	
	50	CDR2	H	H	V	V	
	51		I	I	I	I	
	52		W	W	S	S	
	53		W	W	Y	Y	
	54		D	D	D	D	
	55		D	D	G	G	
			-	-	S	S	
	56		D	D	N	N	
	57		K	K	K	K	
	58		Y	Y	Y	Y	
	59		Y	Y	Y	Y	
	60		N	N	A	A	

ES 2 382 547 T3

(continuación)

Nº KAB	Nº	TIPO	12A11 VH de ratón	12A11 VHv1 HUM	AAA 69734	567123 Línea germinal	Comentario
61	63		P	P	D	D	
62	64		S	S	S	S	
63	65		L	L	V	V	
64	66		K	K	K	K	
65	67		S	S	G	G	
66	68	FR3	R	R	R	R	
67	69		L	L	F	F	vernier (debajo de H2, posiblemente interaccionando con L63) – retromutación en v1
68	70		T	T	T	T	
69	71		I	I	I	I	
70	72		S	S	S	S	
71	73		K	K	R	R	canónico para H2 – retromutación en v1
72	74		D	D	D	D	
73	75		T	T	N	N	vernier (extremo del sitio de unión, posiblemente interaccionando con S30) – retromutación en v1
74	76		S	S	S	S	
75	77		R	K	K	K	
76	78		N	N	N	N	
77	79		Q	T	T	T	
78	80		V	V	L	L	vernier (enterrado bajo H1, posiblemente interaccionando con V35A) – retromutación en v1
79	81		F	Y	Y	Y	
80	82		L	L	L	L	
81	83		K	Q	Q	Q	
82	84		I	M	M	M	
82A	85		T	N	N	N	
82B	86		S	S	S	S	
82C	87		V	L	L	L	
83	88		D	R	R	R	
84	89		T	A	A	A	
85	90		A	E	E	E	
86	91		D	D	D	D	
87	92		T	T	T	T	

ES 2 382 547 T3

(continuación)

Nº KAB	Nº	TIPO	12A11 VH de ratón	12A11 VHv1 HUM	AAA 69734	567123 Línea germinal	Comentario
88	93		A	A	A	A	
89	94		T	V	V	V	
90	95		Y	Y	Y	Y	
91	96		Y	Y	Y	Y	<i>empaquetamiento</i>
92	97		C	C	C	C	
93	98		A	A	A	A	<i>empaquetamiento</i>
94	99		R	R	R	R	<i>canónico</i>
95	100	CDR3	-	-	D	D	
			R	R	R	-	
96	101		T	T	H	-	
97	102		T	T	S	-	
98	103		T	T	S	-	
99	104		A	A	S	A	
100	105		D	D	W	K	
100A	106		Y	Y	Y	L	
100B	107		F	F	Y	L	
101	108		A	A	G	M	
102	109		Y	Y	M	L	
			-	-	D	L	
			-	-	V	I	
103	110		W	W	W	S	<i>empaquetamiento</i>
104	111		G	G	G	G	
105	112		Q	Q	Q	A	
106	113		G	G	G	K	
107	114	FR4	T	T	T	G	
108	115		T	T	T	Q	
109	116		L	V	V	W	
110	117		T	T	T	S	
111	118		V	V	V	P	
112	119		S	S	S	S	
113	120		S	S	S	L	

Los anticuerpos humanizados preferentemente muestran una afinidad de unión específica por Aβ de al menos 10⁷, 10⁸, 10⁹ o 10¹⁰ M⁻¹. Habitualmente el límite superior de la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados para Aβ está en un factor de tres, cuatro o cinco de la de 12A11 (es decir, ~10⁹ M⁻¹). Con frecuencia el límite inferior de la afinidad de unión también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la de 12A11.

5 *Ensamblaje y expresión de VH y VL de 12A11 humanizado, Versión 1*

Se usó ensamblaje mediado por PCR para generar h12A11v1 usando cebadores oligonucleotídicos apropiados. Las secuencias de nucleótidos de 12A11 VL (versión 1) (SEC ID N°: 34) y 12A11VH (versión 1) (SEC ID N°: 35) humanizada se enumeran a continuación en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

Tabla 10. Secuencia de nucleótidos de 12A11VLv1

atgaggctccctgctcagctcctggggctgctgatgctctgggtctctggctccagtgaggGATGTTGTGAT
 GACCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGAGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGA
 10 GCATTGTGCATAGTAATGGAAACACCTACCTGGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTC

 CTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGA
 TTTCCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAAGTTTCACATG

 TTCCTCTCACCTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEC ID N°: 34)

(segmento VL en mayúsculas solo) péptido líder codificado por secuencia de línea germinal de A19 derivada de péptido líder x63397.

15 Tabla 11. Secuencia de nucleótidos de 12A11VHv1 humanizada

atggagtttgggctgagctgggttttccctcgtgctctctcagagaggtgtccagtgctCAAGTTCAGCTGGT
 GGAGTCTGGCGGCGGGTGGTGCAGCCCGACGGTCCCTCAGGCTGTCTTGTGCTTTCTCTGGGTTTTCAC
 TGAGCACTTCTGGTATGAGTGTGGGCTGGATTTCGTCAAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACAC
 ATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTC
 CAAAACACCGTGTACCTCCAGATGAACAGTCTGCGGGCTGAAGATACTGCCGTGTACTACTGTGCTCGAA

 GAACTACTACCGCTGACTACTTTGCCTACTGGGGCCAAGGCACCCTGTACAGTCTCTCTCA (SEC ID
 N°: 35)

Péptido líder (minúsculas) derivado de secuencia donadora de VH n° de acceso M34030.1/aaa69734/M72

20 Las secuencias de aminoácidos de 12A11VL (versión 1) (SEC ID N°: 7) y 12A11VH (versión 1) (SEC ID N°: 10) humanizadas se representan en las Figuras 5A y 5B, respectivamente.

B. Anticuerpos 12A11 humanizados – Versiones 2, 2.1 y 3

Los restos de vernier (por ejemplo, S28T, L48V, L67F, V78L) contribuyen indirectamente a la conformación de CDR y se postuló que eran de menos importancia para la perturbación conformacional. Los restos diana se mutaron por mutagénesis dirigida usando un kit de Strategene y h12A11 VHv1 en un plásmido pCRS como el molde de mutagénesis para surgir en clones correspondientes a la versión 2. Se subclonó un inserto de región V verificado secuenciado de la versión 2 en los sitios BamHI/HindIII del vector de expresión de cadena pesada pCMV-Cgammal para producir anticuerpo h12A11v2 recombinante. Se creó de forma similar un anticuerpo versión 2.1 que tenía cada una de las mutaciones de resto de vernier anteriores (es decir, eliminación de retromutaciones) además de mutación en la posición T73N. Un anticuerpo versión 3 de forma similar tenía cada una de las mutaciones anteriores, S28T, L48V, L67F, V78L, además de una mutación en la posición K71R.

C. Anticuerpos 12A11 humanizados – Versiones 4 a 6

Se diseñaron versiones de 12A11 humanizado adicionales que conservaban retromutaciones en restos canónicos y de empaquetamiento pero que eliminaron las retromutaciones en uno (versiones 4.1 a 4.4), dos (versiones 5.1 a 5.6) o tres (versiones 6.1 a 6.4) restos de vernier. Se realizó mutagénesis dirigida y construcción de clones como se describe en la subparte B, anteriormente. Se expresaron anticuerpos recombinantes en células COS y se purificaron a partir de sobrenadantes COS. Versiones adicionales pueden incluir combinaciones de las anteriores, por ejemplo, restos humanos en 1, 2, 3, 4 o 5 restos de vernier en combinación con al menos un resto de empaquetamiento y/o canónico (por ejemplo, restos humanos en las posiciones 28, 37, 48, 67, 71 y 78 o restos humanos en las posiciones 28, 37, 48, 67, 71, 73 y 78).

D. Anticuerpos 12A11 humanizados – Versiones 7 y 8

Se crea una séptima versión de 12A11 humanizado que tiene cada una de las retromutaciones indicadas para la versión 1, excepto la retromutación T → S en el resto 28 (vernier) y la retromutación V → I en el resto 37 (empaquetamiento). Se crea una octava versión de 12A11 humanizado que tiene cada una de las retromutaciones indicadas para la versión 1, excepto para la retromutación N → T en el resto 73 (vernier). Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de 12A11 humanizado versión 7 y 8 se exponen como SEC ID N°: 30 y 31, respectivamente.

En comparación con la versión 1, la versión 7 contiene solo 7 retromutaciones. La retromutación T28S es conservativa y se elimina en la versión 7 de la cadena pesada. La retromutación en el resto de empaquetamiento V37I también se elimina en la versión 7. En comparación con la versión 1, la versión 8 contiene solo 8 retromutaciones. En la versión 8, se elimina la retromutación N73T (vernier).

Las versiones adicionales pueden incluir combinaciones de las anteriores, por ejemplo, restos humanos (por ejemplo, eliminación de retromutaciones) en 1, 2, 3, 4 (o 5) restos seleccionados de las posiciones 29, 48, 78 y 73, opcionalmente en combinación con eliminación de retromutación en al menos un resto de empaquetamiento (por ejemplo, posición 37) y/o al menos un resto canónico.

Ejemplo VI: Textualización funcional de anticuerpos 12A11 humanizados

Se clonó 12A11 humanizado versión 1 como se describe en el Ejemplo V. Se produjo 12A11 humanizado por expresión transitoria en células COS y se purificó de acuerdo con metodologías reconocidas en la técnica. La actividad de unión del anticuerpo humanizado se demostró en primer lugar por un ensayo de ELISA cualitativo (datos no mostrados). Se comparó adicionalmente 12A11 humanizado versión 1 con sus homólogos murinos y quiméricos con respecto a dos propiedades: unión a antígeno (ELISA cuantitativo de Aβ) y afinidad relativa. La actividad de unión de h12A11v1 se demostró en el ELISA cuantitativo de Aβ y se descubrió que era idéntica a las formas murina y quimérica de 12A11 (véase Figura 7).

La afinidad de anticuerpo h12A11v1 también se comparó con anticuerpos 12A11 murinos y quiméricos por un ELISA competitivo de Aβ. Para el ensayo de unión competitiva, se usó un 12A11Cγ2a de ratón recombinante conjugado con biotina (12A11 con isotipo desplazado). La actividad de unión del m12A11 Cγ2a biotinilado con Aβ 1-42 agregado se confirmó por un ensayo de ELISA usando estreptavidina-HRP como indicador. Una comparación directa de unión de Aβ con las dos isoformas de 12A11 (Cγ1, Cγ2a), usando HRP anti-ratón de cabra conjugada con HRP como indicador, confirmó que el 12A11Cγ2a recombinante conjugado con biotina es comparable con el anticuerpo de ratón Cγ1 original.

El estudio de unión de competición empleó el m12A11 Cγ2a conjugado con biotina a una concentración fijada y competición con una serie de concentraciones de anticuerpos de ensayo como se indica en la Figura 8. La Figura 8 muestra el resultado del ensayo competitivo de h12A11v1 que compara h12A11 v1 con formas murinas y quiméricas. El 12A11v1 humanizado compitió dentro de un valor de CI50 2X con sus homólogos murinos y quiméricos. Este dato es coherente con la determinación de afinidad usando tecnología Biacore (datos no mostrados), que indicó valores de KD de 38 nM y 23 nM para el Cγ2a murino y h12A11v1, respectivamente. En resumen, los hallazgos sugieren que h12A11 conserva las propiedades de unión a antígeno y afinidad de su homólogo murino original.

Se transfectaron transitoriamente células COS con diferentes combinaciones de 12A11VH humanizado h12A11VLv1. El medio condicionado se recogió 72 horas después de la transfección. Se determinó una concentración de anticuerpo en medio condicionado a partir de células COS transfectadas por un ELISA de IgG humana cuantitativo. El ensayo de unión de agregado de Aβ (1-42) cuantitativo confirmó que h12A11v2, v2.1 y v3 son comparables con h12A11v1 y con 12A11 quimérico con respecto a unión a antígeno. Además, las versiones 5.1-5.6 y 6.1-6.3 muestran actividades de unión similares cuando se ensayan en este ensayo de unión. La versión 6.4 mostró cierta pérdida de actividad en el ensayo pero la actividad se restauró notablemente en v2.

También se compararon las propiedades de unión de 12A11 y h12A11v1 usando tecnología Biacore. 12A11 y h12A11v1 mostraron perfiles de unión similares cuando se expusieron a péptido Aβ inmovilizado de baja o alta densidad (péptido bio-DAE). También se realizó análisis cinético de 12A11 frente a h12A11v1. En estos estudios la tecnología Biacore se usó para medir la unión de anticuerpo soluble con péptido DAE biotinilado unido a fase sólida. El péptido se inmovilizó en microplacas biosensoras de estreptavidina, después se aplicaron concentraciones diversas de cada anticuerpo por triplicado y la unión se midió en función del tiempo. Los datos cinéticos se analizaron usando software BIAevaluation aplicado a un modelo bivalente. Las constantes de disociación (k_d) y asociación (k_a) aparentes se calcularon a partir de las regiones apropiadas de los sensogramas usando un análisis global. La constante de afinidad de la interacción entre bio-DAE10 y los anticuerpos se calculó a partir de las constantes de tasas cinéticas. A partir de estas mediciones se derivaron las constantes de tasa de disociación (k_d) y asociación (k_a) aparentes y se usaron para calcular un valor de K_D para la interacción. La Tabla 12 incluye un resumen del análisis cinético de unión a Aβ de anticuerpos 12A11 como se determina por análisis de Biacore.

Tabla 12:

Modelo bivalente (análisis global)					
Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (nm)	Chi2
m12A11	1,05E + 05	3,98E - 03	2,64E + 07	38,00	0,247
h12A11v1	1,47E + 05	3,43 - 03	4,29E + 07	23,30	0,145

Los datos indican que 12A11 humanizado v1 tiene una afinidad similar por el péptido Aβ en comparación con 12A11 murino parental.

5 Ejemplo VII. Prevención y tratamiento de sujetos humanos

Se realiza un ensayo de fase I de dosis sencilla para determinar la seguridad en seres humanos. Se administra un agente terapéutico en dosificaciones crecientes a diferentes pacientes comenzando a partir de aproximadamente 0,01 del nivel de eficacia supuesta y aumentado en un factor de tres hasta que se alcanza un nivel de aproximadamente 10 veces la dosificación de ratón eficaz.

10 Se realiza un ensayo de fase II para determinar la eficacia terapéutica. Se seleccionan pacientes con enfermedad de Alzheimer de temprana a media definida usando criterios de la Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (ADRDA) para AD probable. Los pacientes adecuados tienen una puntuación en el intervalo de 12-26 en el Mini Examen de Estado Mental (MMSE). Otros criterios de selección son que los pacientes probablemente sobreviven durante el transcurso del estudio y carecen de problemas de complicaciones tales como uso de medicaciones conjuntas que puedan interferir. Se realizan evaluaciones de línea basal de función del paciente usando mediciones psicométricas clásicas, tales como el MMSE y el ADAS, que es una escala exhaustiva para evaluar pacientes con estado y función de Enfermedad de Alzheimer. Estas escalas psicométricas proporcionan una medida de la progresión de la afección de Alzheimer. También pueden usarse escalas cualitativas de vida adecuadas para controlar el tratamiento. La progresión de la enfermedad también puede controlarse por MRI. También pueden controlarse los perfiles sanguíneos de los pacientes incluyendo ensayos de anticuerpos específicos de inmunógenos y respuestas de linfocitos T.

25 Después de las mediciones de línea basal, los pacientes comienzan a recibir el tratamiento. Se seleccionan de forma aleatoria y se tratan con agente terapéutico o placebo de una manera ciega. Se controla a los pacientes al menos cada seis meses. La eficacia se determina por una reducción significativa de la progresión de un grupo de tratamiento en relación con un grupo de placebo.

30 Se realiza un segundo ensayo de fase II para evaluar la conversión de los pacientes de pérdida de memoria temprana no de Enfermedad de Alzheimer, denominada en ocasiones deterioro de la memoria asociado a la edad (AAMI) o deterioro cognitivo leve (MCI), a enfermedad de Alzheimer probable como se define por los criterios de ADRDA. Los pacientes con alto riesgo de conversión a la enfermedad de Alzheimer se seleccionan a partir de una población no clínica explorando poblaciones de referencia con respecto a señales tempranas de pérdida de memoria u otras dificultades asociadas con sintomatología pre-Alzheimer, historial familiar de enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genético, edad, sexo y otras características que se ha descubierto que predicen alto riesgo para Enfermedad de Alzheimer. Se recogen puntuaciones de línea basal en medidas adecuadas que incluyen el MMSE y el ADAS junto con otras medidas diseñadas para evaluar una población más normal. Estas poblaciones de pacientes se dividen en grupos adecuados con comparación de placebo frente a alternativas de dosificación con el agente. Estas poblaciones de pacientes se siguen en intervalos de aproximadamente seis meses, y el criterio de valoración para cada paciente es si él o ella pasa o no a Enfermedad de Alzheimer probable como se define por los criterios de ADRDA al final de la observación.

40 Aunque la invención anterior se ha descrito en detalle para fines de claridad de entendimiento, resultará obvio que pueden realizarse ciertas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

A partir de lo anterior, resultará evidente que la divulgación posibilita varios usos. Por ejemplo, la divulgación posibilita el uso de cualquiera de los anticuerpos para Aβ descritos anteriormente en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de enfermedad amiloidogénica o en la preparación de un medicamento o composición de diagnóstico para su uso en la misma.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Neuralab Limited and Wyeth

5

<120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE RECONOCEN PÉPTIDO BETA AMILOIDE

<130> P042478EP

<140> EP 04776252.1

<141> 01-06-2004

10

<150> 60/474654

<151> 30-05-2003

<160> 35

15

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 393

20

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

25

<222> (1)...(393)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)...(57)

30

<400> 1

ES 2 382 547 T3

```

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
15 20 25

gta cat agt aat gga aac acc tac tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
80 85 90

ttt caa agt tca cat gtt cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg 384
Phe Gln Ser Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
95 100 105

gag ctg aaa 393
Glu Leu Lys
110

```

<210> 2

<211> 131

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)...(19)

<400> 2

ES 2 382 547 T3

```

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
15 20 25
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
80 85 90
Phe Gln Ser Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
95 100 105
Glu Leu Lys
110

```

<210> 3

<211> 417

5

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)...(417)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1) ... (57)

15

<400> 3

```

atg gac agg ctt act act tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat 48
Met Asp Arg Leu Thr Thr Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
-15 -10 -5

```

ES 2 382 547 T3

gtc ttg tcc caa gtt act cta aaa gag tct ggc cct ggg ata ttg aag	96
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys	
1 5 10	
ccc tca cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg	144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu	
15 20 25	
agc act tct ggt atg agt gta ggc tgg att cgt cag cct tca ggg aag	192
Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys	
30 35 40 45	
ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tgg tgg gat gat gat aag tac tat	240
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr	
50 55 60	
aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg	
65 70 75	
aac cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac act gca gat act gcc	336
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala	
80 85 90	
act tac tac tgt gct cga aga act act acg gct gac tac ttt gcc tac	384
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr	
95 100 105	
tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca	417
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

<210> 4

<211> 139

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)...(19)

<400> 4

ES 2 382 547 T3

Met	Asp	Arg	Leu	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Leu	Leu	Ile	Val	Pro	Ala	Tyr
				-15				-10						-5	
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Lys
			1				5					10			
Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
	15					20					25				
Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys
30					35					40					45
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr
				50					55					60	
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Arg
			65					70					75		
Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala
		80					85					90			
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr
	95					100					105				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser					

110

115

120

<210> 5

<211> 429

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

10

<400> 5

```

cmgmaagctt gccgccacca tgaagttgcc tgttaggctg ttgggtgctga tgttctggat 60
tcctgcttcc agcagtgatg ttttgatgac ccaaactcca ctctccctgc ctgtcagtct 120
tggagatcaa gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc attgtacata gtaatggaaa 180
cacctactta gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccaaagctcc tgatctacaa 240
agtttccaac cgattttctg gggcccaga caggttcagt ggcagtgatg cagggacaga 300
tttcacactc aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg ggaatttatt actgctttca 360
aagttcacat gttcctctca cgttcggtgc tgggaccaag ctggagctga aacgtgagtg 420
gatcctmgr                                     429
    
```

<210> 6

15

<211> 445

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> sintético

ES 2 382 547 T3

<400> 6

```

aagcttgccg ccaccatgga caggcttact acttcattcc tgctgctgat tgtccctgca 60
tatgtcttgt cccaagttac tctaaaagag tctggccctg ggatattgaa gccctcacag 120
accctcagtc tgacttggtc tttctctggg ttttctactga gcacttctgg tatgagtgta 180
ggctggattc gtcagccttc agggaagggt ctggagtggc tggcacacat ttggtgggat 240
gatgataagt actataaacc atccctgaag agccggctca caatctcaa ggatacctcc 300
agaaaccagg tattcctcaa gatcaccagt gtggacactg cagatactgc cacttactac 360
tgtgctcgaa gaactactac ggctgactac tttgcctact ggggccaagg caccactctc 420
acagtctcct caggtgagtg gatcc 445
    
```

5 <210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> h12A11v1 sintético – región VL

<400> 7

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
          20          25          30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
          85          90          95
Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
    
```

100 105 110

15 <210> 8

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> SEÑAL

ES 2 382 547 T3

<222> (1)...(22)

<400> 8

```

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
-20 -15 -10
Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
-5 1 5 10
Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
15 20 25
Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu
30 35 40
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn
45 50 55
Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
60 65 70
Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
75 80 85 90
Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105
Thr Lys Leu Glu Ile Lys
110

```

5

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)...(20)

15

<400> 9

ES 2 382 547 T3

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 -20 -15 -10 -5
 Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 1 5 10
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 15 20 25
 Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 30 35 40
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 45 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 80 85 90
 Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro
 95 100

<210> 10

<211> 120

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v1 – región VH

10

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 11

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

5 <222> (1)...(19)

<400> 11

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
      -15                      -10                      -5
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
      1                      5                      10
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      15                      20                      25
Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      30                      35                      40                      45
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
      50                      55
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
      65                      70                      75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
      80                      85                      90
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Gly Met
      95                      100                      105
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      110                      115                      120
    
```

10 <210> 12

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> SEÑAL

<222> (1)...(19)

<400> 12

20

ES 2 382 547 T3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 -15 -10 -5
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 1 5 10
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 30 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 50 55 60
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 65 70 75
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Lys Leu Leu Met Leu Leu Ile Ser Gly
 95 100 105
 Ala Lys Gly Gln Trp Ser Pro Ser Leu
 110 115

<210> 13

<211> 120

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v2 sintético

10

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

15

<211> 120

<212> PRT

ES 2 382 547 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v2.1 sintético

5

<400> 14

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
      65      70      75      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85      90      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120
    
```

10

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> h12A11v3 sintético

<400> 15

ES 2 382 547 T3

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
      65      70      75      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85      90      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120

```

<210> 16

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v4.1 sintético

10

<400> 16

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
      65      70      75      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85      90      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120

```

15 <210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 382 547 T3

<220>

<223> h12A11v4.2 sintético

<400> 17

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
          20           25           30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35           40           45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
          50           55           60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
          65           70           75           80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
          85           90           95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
          100           105           110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115           120
    
```

5

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v4.3 sintético

15

<400> 18

```

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

ES 2 382 547 T3

```

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

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35                      40                      45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50                      55                      60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
      65                      70                      75                      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85                      90                      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100                     105                     110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115                      120

```

<210> 19

<211> 120

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v4.4 sintético

10

<400> 19

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
      20                      25                      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35                      40                      45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50                      55                      60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
      65                      70                      75                      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85                      90                      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100                     105                     110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115                      120

```

<210> 20

15

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 382 547 T3

<220>

<223> h12A11v5.1 sintético

<400> 20

5

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Val	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val
65					70					75					80
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210> 21

<211> 120

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v5.2 sintético

15

<400> 21

ES 2 382 547 T3

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
           20           25           30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
           35           40           45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
           50           55           60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65           70           75           80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
           85           90           95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
           100           105           110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
           115           120

```

<210> 22

<211> 121

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v5.3 sintético

10

<400> 22

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
           20           25           30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
           35           40           45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
           50           55           60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65           70           75           80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
           85           90           95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
           100           105           110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val
           115           120

```

15

<210> 23

<211> 121

ES 2 382 547 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> h12A11v5.4 sintético

<400> 23

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35				40						45			
Trp	Val	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55						60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val
65					70					75					80
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Val							
		115					120								

10

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> h12A11v5.5 sintético

<400> 24

ES 2 382 547 T3

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
      20           25           30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35           40           45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50           55           60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65           70           75           80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85           90           95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115           120

```

<210> 25

<211> 120

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v5.6 sintético

10

<400> 25

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
      20           25           30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35           40           45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50           55           60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65           70           75           80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85           90           95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115           120

```

<210> 26

15

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A116.1 sintético

<400> 26

5

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
      65      70      75      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85      90      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120
    
```

<210> 27

<211> 120

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v6.2 sintético

15

<400> 27

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1      5      10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
      65      70      75      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85      90      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120
    
```

ES 2 382 547 T3

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v6.3 sintético

10 <400> 28

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35          40          45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50          55          60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65          70          75          80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85          90          95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115          120
    
```

<210> 29

15 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> h12A11v6.4 sintético

<400> 29

ES 2 382 547 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Val	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55						60			
Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
65					70					75					80
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210> 30

<211> 120

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h12A11v7 sintético

10

<400> 30

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55						60			
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val
65					70					75					80
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

15

<210> 31

<211> 120

ES 2 382 547 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región bisagra de igg sintética

5

<400> 33

Leu Glu Gly Gly Pro
1 5

<210> 34

10

<211> 396

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> secuencia VL de 12A11 v1 humanizada

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)...(60)

20

<400> 34

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctgatgctct gggctctctgg ctccagtggg 60
gatgttgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttgaga gccagcctcc 120
atctcttgca gatctagtc gagcatttg catagtaat gaaacaccta cctggaatgg 180
tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 240
tctggggctc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ttcaaagttc acatgttctc 360
ctcaccttcg gtcaggggac caagctggag atcaaa 396

```

<210> 35

25

<211> 417

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> secuencia NH de 12A11 v1 humanizada

ES 2 382 547 T3

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)...(57)

5

<400> 35

```
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttc tgagaggtgt ccagtgtcaa 60
gttcagctgg tggagtctgg cggcgggggtg gtgcagcccg gacggtcctt caggetgtct 120
tgtgctttct ctgggttttc actgagcact tctggatga gtgtgggctg gattcgtcag 180
gctccaggga agggctctgga gtggctggca cacatttggg gggatgatga taagtactat 240
aaccatccc tgaagagccg gctcacaatc tccaaggata cctccaaaaa caccgtgtac 300
ctccagatga acagtctgcg ggctgaagat actgccgtgt actactgtgc tcgaagaact 360
actaccgctg actactttgc ctactggggc caaggcacca ctgtcacagt ctctca 417
```

REIVINDICACIONES

1. Una inmunoglobulina 12A11 humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable de la secuencia de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina 12A11 de SEC ID N°: 2 y una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable de la secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina 12A11 de SEC ID N°: 4.
2. La inmunoglobulina 12A11 humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 que comprende una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada, en la que
- (a) la cadena ligera humanizada comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad correspondientes del dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina 12A11 de ratón designado SEC ID N°: 2 y un armazón de región variable de una secuencia flanqueante de región variable de cadena ligera humana, siempre que al menos un resto flanqueante seleccionado del grupo que consiste en un resto canónico, un resto de vernier, un resto de empaquetamiento y un resto poco común esté ocupado por el mismo resto aminoacídico presente en la posición equivalente del armazón de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina 12A11 de ratón; y
- (b) la cadena pesada humanizada comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CRD3) que tienen secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad correspondientes del dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina 12A11 de ratón designado SEC ID N°: 4 y un armazón de región variable de una secuencia flanqueante de región variable de cadena pesada humana, siempre que al menos un resto flanqueante seleccionado de un segundo grupo que consiste en un resto canónico, un resto de vernier, un resto de empaquetamiento y un resto poco común esté ocupado por el mismo resto aminoacídico presente en la posición equivalente del armazón de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina 12A11 de ratón;
- uniéndose la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma específicamente a péptido beta amiloide (A β) con una afinidad de unión de al menos $10^7 M^{-1}$, teniendo la inmunoglobulina 12A11 de ratón la cadena ligera con un dominio variable designado SEC ID N°: 2 y la cadena pesada con un dominio variable designado SEC ID N°: 4.
3. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 2, en la que al menos un resto flanqueante en la cadena ligera está ocupado por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la cadena ligera de 12A11 en una posición seleccionada del grupo que consiste en L2, L4, L36, L38, L40, L44, L46, L47, L48, L49, L64, L66, L68, L69, L71, L87 y L98 numeradas de acuerdo con Kabat y al menos un resto flanqueante en la cadena pesada está ocupado por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la cadena pesada de 12A11 en una posición seleccionada del grupo que consiste en H2, H24, H26, H27, H28, H29, H37, H39, H45, H47, H48, H 67, H71, H73, H78, H91, H93, H94 y H103 numeradas de acuerdo con Kabat.
4. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 2, en la que al menos tres restos flanqueantes en la cadena ligera están ocupados por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la cadena ligera de 12A11 en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L2, L4, L36, L38, L40, L44, L46, L47, L48, L49, L64, L66, L68, L69, L71, L87 y L98 numeradas de acuerdo con Kabat y al menos tres restos flanqueantes en la cadena pesada están ocupados por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la cadena pesada de 12A11 en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en H2, H24, H26, H27, H28, H29, H37, H39, H45, H47, H48, H67, H71, H73, H78, H91, H93, H94 y H103 numeradas de acuerdo con Kabat.
5. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 2, en la que todas las posiciones de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en L2, L4, L36, L38, L40, L44, L46, L47, L48, L49, L64, L66, L68, L69, L71, L87 y L98 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la cadena ligera de 12A11 de ratón de SEC ID N°: 2.
6. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 2, en la que todas las posiciones de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en H2, H24, H26, H27, H28, H29, H37, H39, H45, H47, H48, H67, H71, H73, H78, H91, H93, H94 y H103 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la cadena pesada de 12A11 de ratón de SEC ID N°: 4.
7. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en la que el armazón de región variable de cadena ligera humanizada es un armazón de región variable de cadena ligera humano de un anticuerpo del subgrupo II humano K64 (AIMS4) (n° de acceso BAC01733).
8. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es un armazón de región variable de cadena pesada humano de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734).

9. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en la que la cadena ligera de región variable humanizada se designa SEC ID N° 7.
- 5 10. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H48, H67, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, L, L, K, T y V, respectivamente.
- 10 11. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37, H71 y H73 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I, K y T, respectivamente.
- 15 12. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37 y H71 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I y K, respectivamente.
- 20 13. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29 y H37 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L e I, respectivamente.
- 25 14. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37, H48, H67, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I, L, L, K, T y V, respectivamente.
- 30 15. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H67, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, L, K, T y V, respectivamente.
- 35 16. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H48, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, L, K, T y V, respectivamente.
- 40 17. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H48, H67, H71 y H73 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, L, L, K y T, respectivamente.
- 45 18. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37, H67, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I, L, K, T y V, respectivamente.
- 50 19. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37, H48, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I, L, K, T y V, respectivamente.
- 55 20. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37, H48, H67, H71 y H73 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I, L, L, K y T, respectivamente.
21. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo de subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, K, T y V, respectivamente.
22. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (n° de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H67, H71 y H73 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, L, K y T, respectivamente.

23. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (nº de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H48, H71 y H73 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, L, K y T, respectivamente.
- 5 24. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (nº de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I, K, T y V, respectivamente.
- 10 25. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (nº de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37, H67, H71 y H73 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I, L, K y T, respectivamente.
- 15 26. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (nº de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H37, H48, H71 y H73 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, I, L, K y T, respectivamente.
- 20 27. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (nº de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H71 y H73 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, K y T, respectivamente.
28. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (nº de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H29, H48, H67, H71, H73 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, L, L, L, K, T y V, respectivamente.
- 25 29. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 7-9, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada es de un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (nº de acceso AAA69734) y en la que las posiciones H24, H28, H29, H37, H48, H67, H71 y H78 numeradas de acuerdo con Kabat están ocupadas por F, S, L, I, L, L, K y V, respectivamente.
- 30 30. Una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno que tiene una región variable de cadena ligera humanizada que comprende los aminoácidos 1-112 de SEC ID N°: 7 y una región variable de cadena pesada humanizada que comprende los aminoácidos 1-120 de SEC ID N°: 10.
- 35 31. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 2, en la que la región variable de cadena pesada humanizada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 1-120 de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 30 y SEC ID N°: 31; y en la que la región variable de cadena ligera humanizada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 1-112 de SEC ID N°: 7.
- 40 32. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 2, en la que la región variable de cadena pesada humanizada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 1-121 de SEC ID N°: 22 o SEC ID N°: 23; y en la que la región variable de cadena ligera humanizada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 1-112 de SEC ID N°: 7.
- 45 33. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en la que el isotipo es IgG1 humana.
34. La inmunoglobulina humanizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, que comprende una región Fc que tiene una función efectora alterada.
35. Una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma de cualquiera de las reivindicaciones 1-34 y un vehículo farmacéutico.
- 50 36. La inmunoglobulina humanizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-34, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad amiloidogénica.
37. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 36, para su uso en la reducción de la carga neurítica.
38. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 36, en la que la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.
39. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 36, para su uso en una dosificación eficaz en el intervalo de

0,01 a 5 mg/kg de peso corporal.

40. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 39, para uso en una dosificación eficaz de 1 mg/kg de peso corporal.
- 5 41. Una inmunoglobulina quimérica o fragmento de unión a antígeno de la misma, que comprende la secuencia de región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 2 y la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 4 y secuencias de región constante de una inmunoglobulina humana.
42. Un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena pesada humanizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-32.
- 10 43. Un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera humanizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 7 y 9.
44. Ácidos nucleicos aislados que codifican respectivamente una región variable de cadena pesada humanizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6, 8 y 10-32 y una región variable de cadena ligera humanizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 7 y 9.
- 15 45. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.
46. Un vector o vectores que comprenden un ácido nucleico o ácidos nucleicos de una cualquiera de las reivindicaciones 42-45.
47. Una célula huésped aislada que comprende un vector o vectores de la reivindicación 46.
- 20 48. Un procedimiento para producir una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 47 en condiciones tales que se produzca la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno y aislar el anticuerpo de la célula huésped o del cultivo.
49. Un animal transgénico no humano que expresa un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 42-46.
- 25 50. El animal transgénico no humano de la reivindicación 49, en el que el polipéptido se expresa en la leche de dicho animal.

FIG. 1

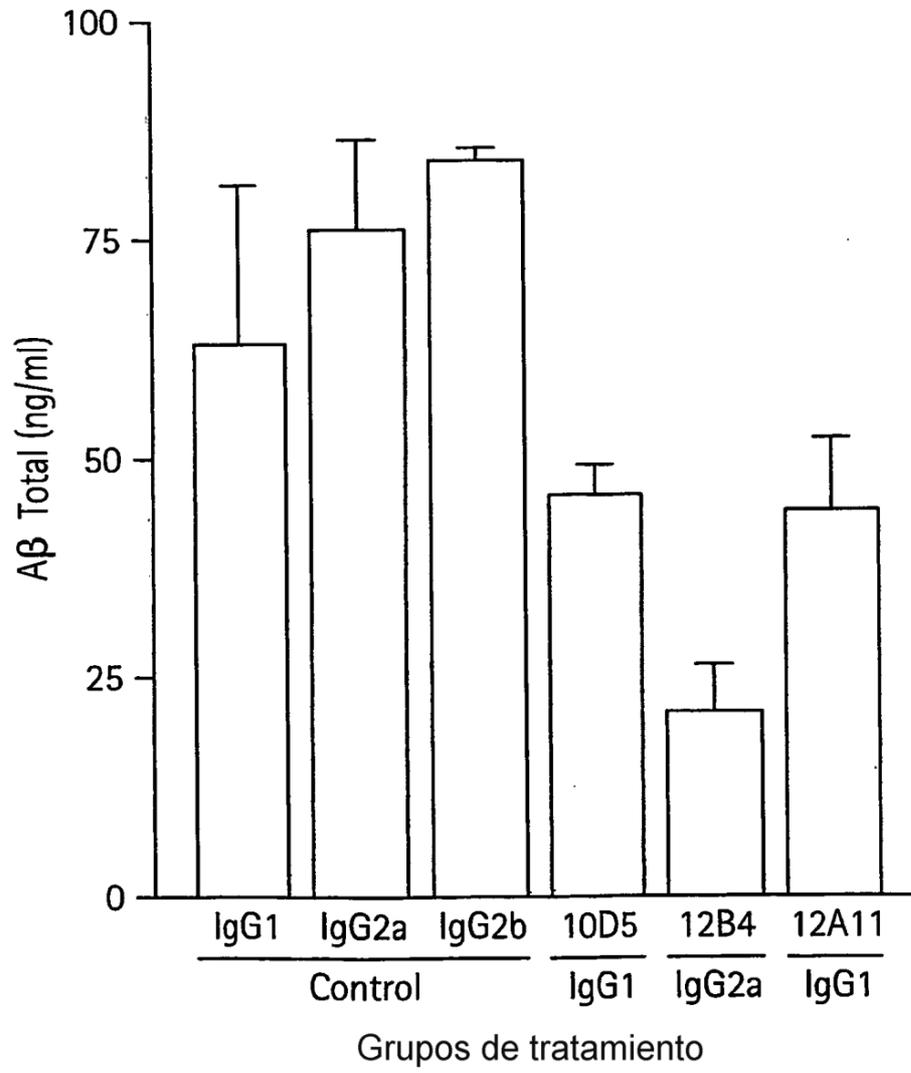


FIG. 2A

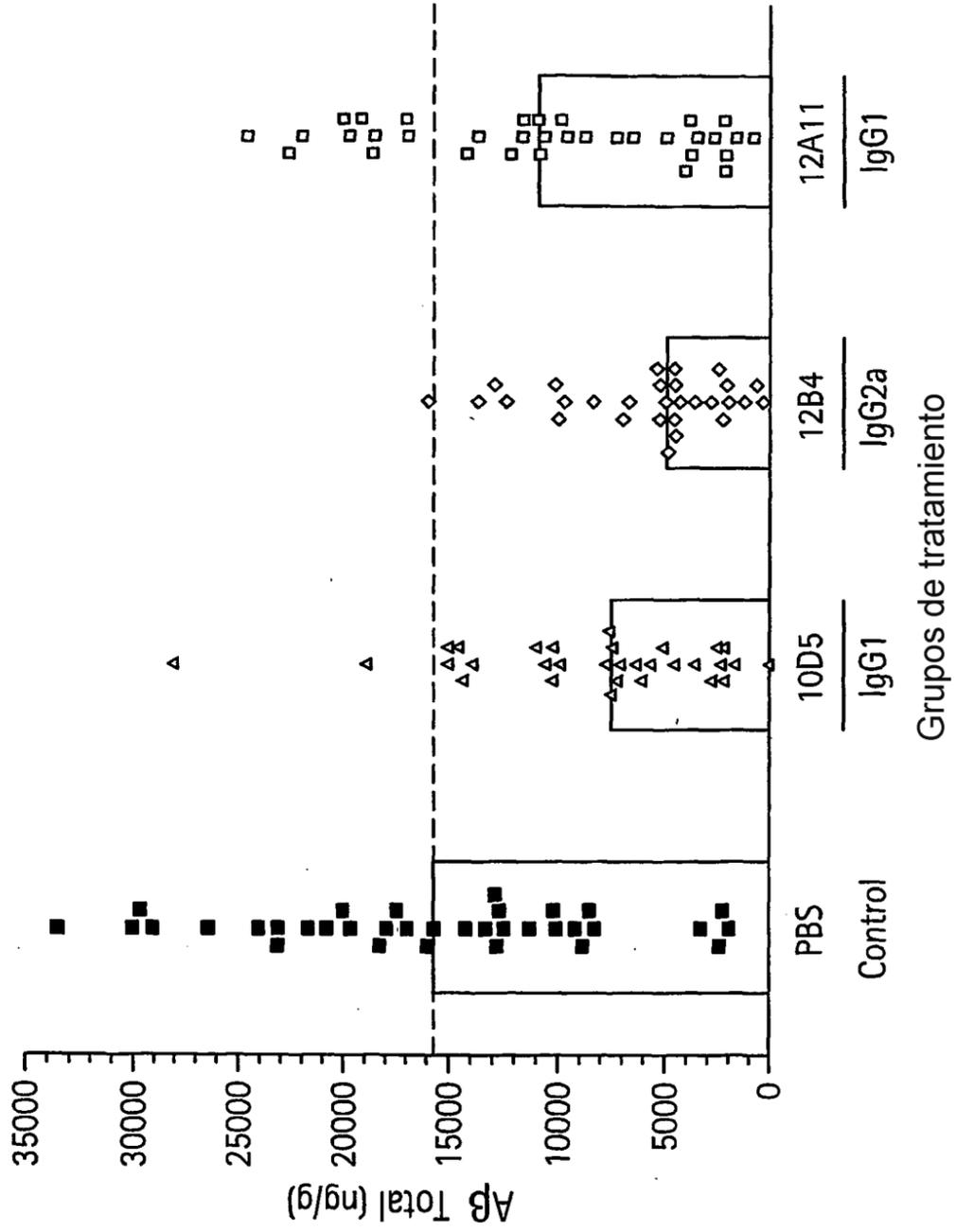


FIG. 2B

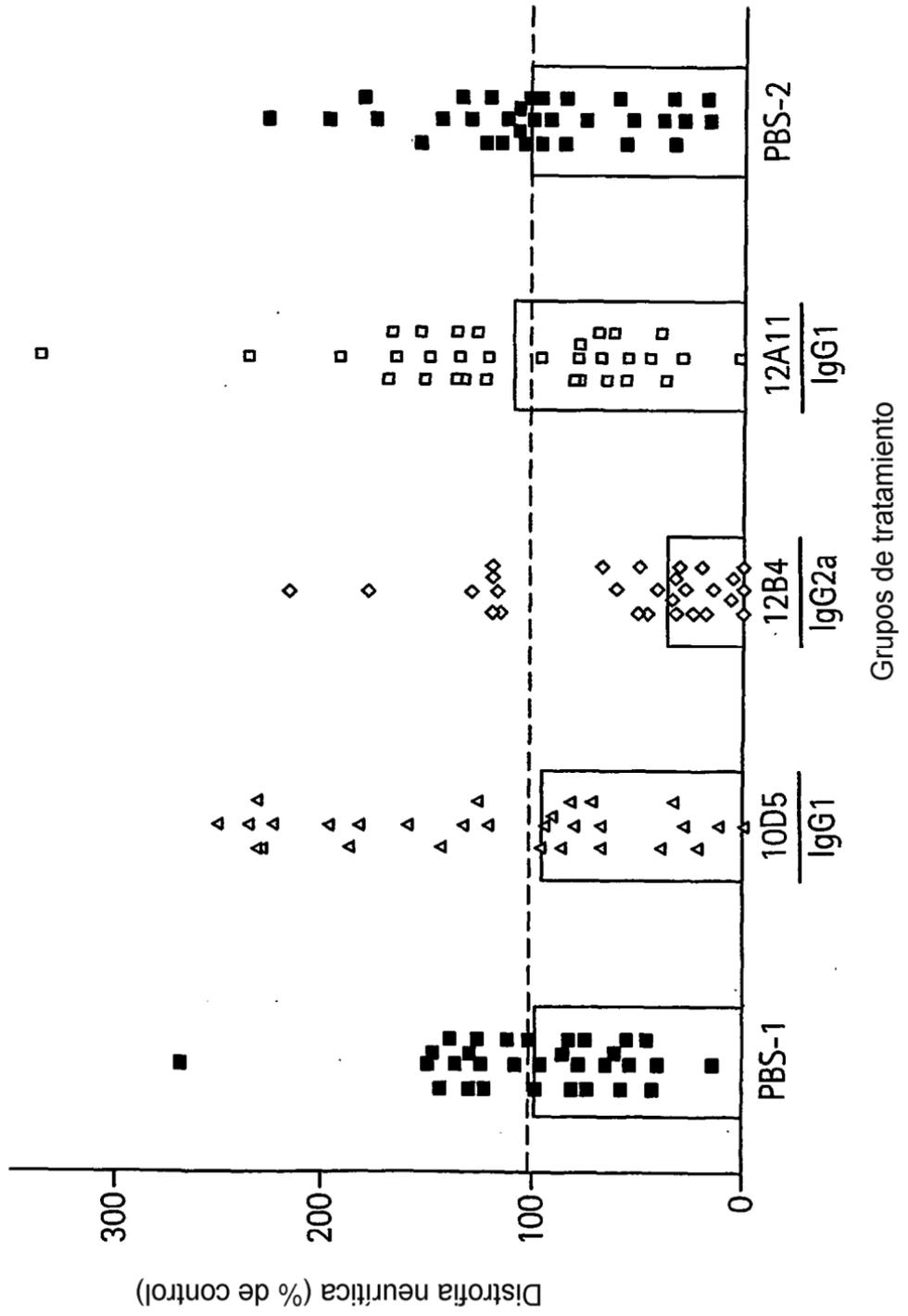


FIG. 3A

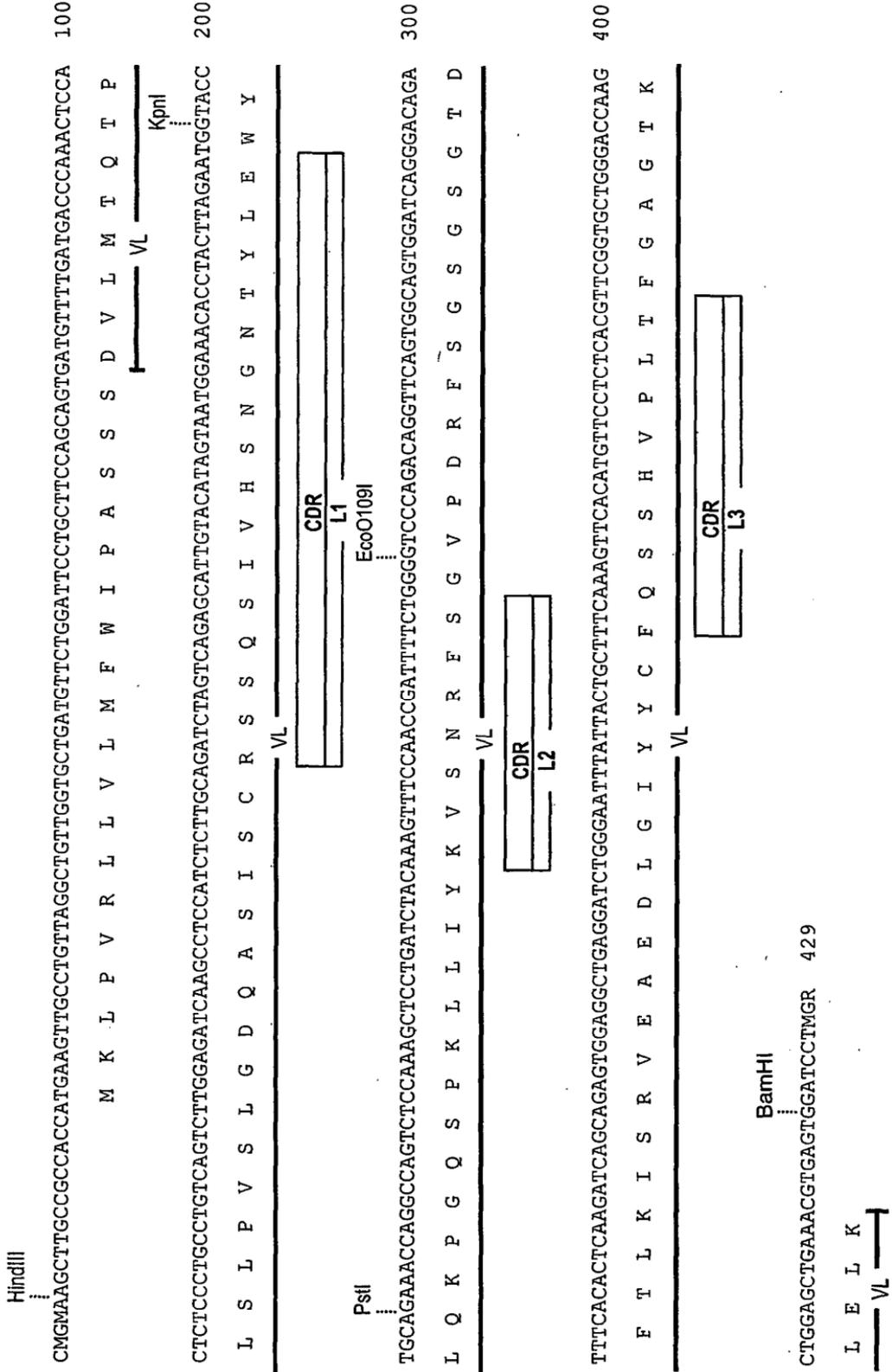


FIG. 3B

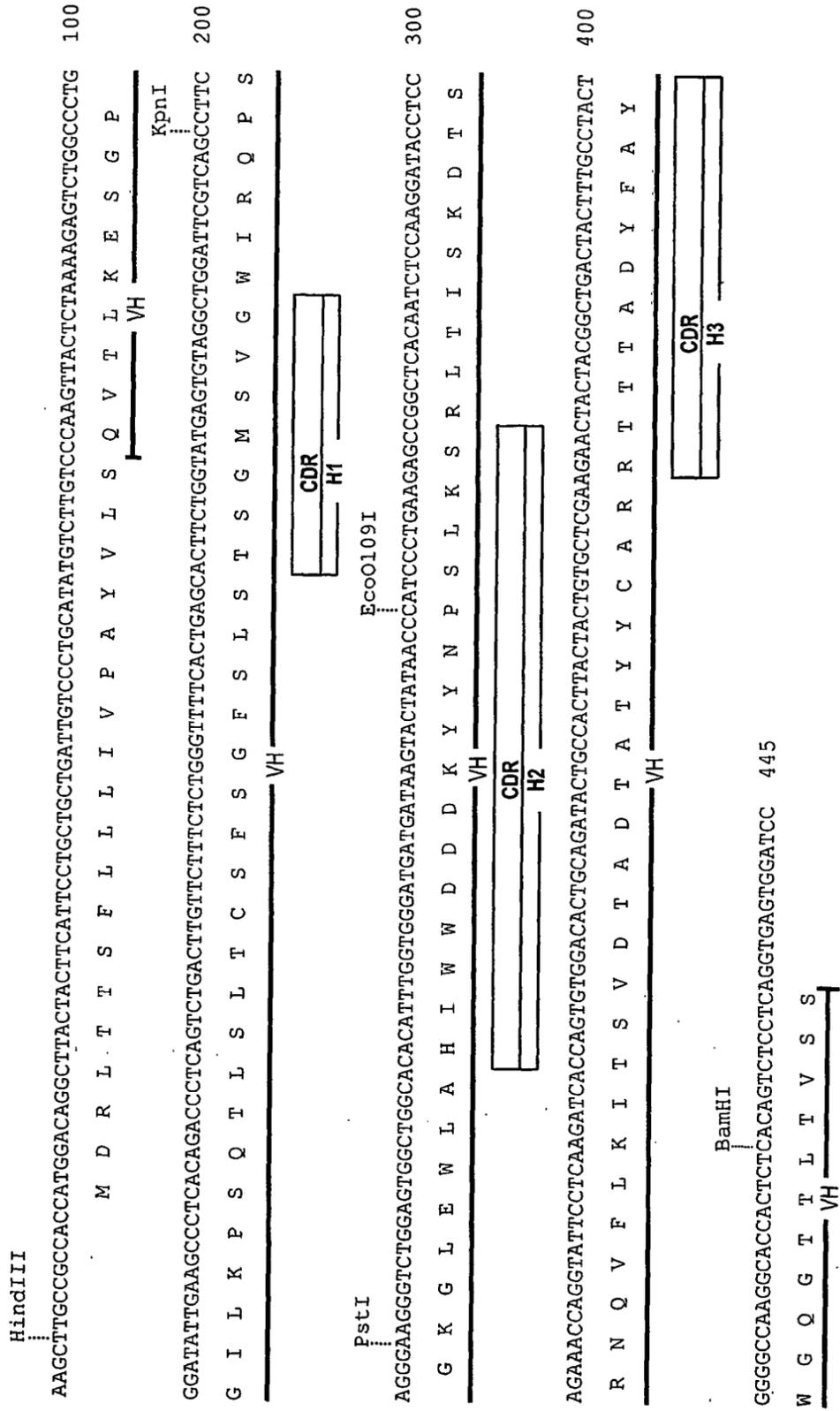


FIG. 4

Ensayo de unión de A β 1-42
 ch3D6/h3D6v2/ch12B4/h12B4v1/ch12A11

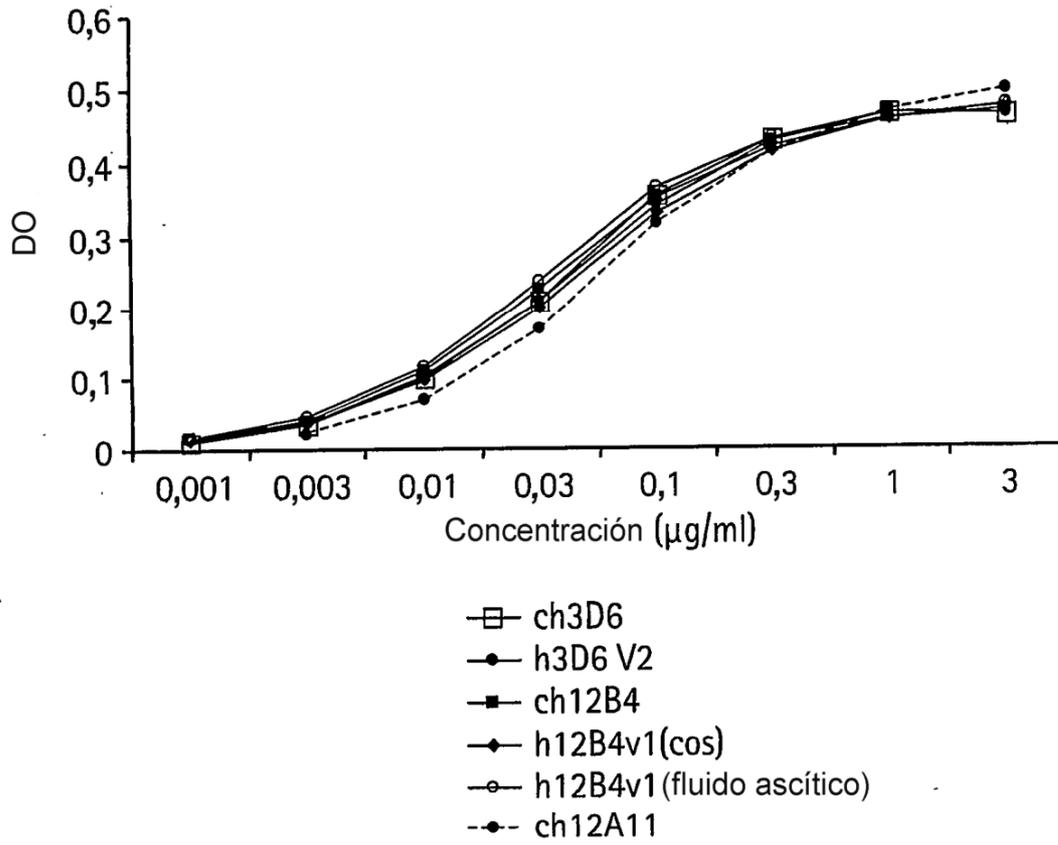


FIG.6A

QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFSLIS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v1
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v2
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v2.1
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v3
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v4.1
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFSLIS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v4.2
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFSLIS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v4.3
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFSLIS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v4.4
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.1
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.2
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.3
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.4
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFSLIS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.5
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFSLIS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.6
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v6.1
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v6.2
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v6.3
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFSLIS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v6.4
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WVRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v7
QVQLVESGGGVVQPGRSIRLSCAFSGFSLIS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v8

FIG. 6B

R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	G	Q	T	T	V	T	V	S	v1			
R	F	T	I	S	K	D	t	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v2
R	F	T	I	S	K	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v2.1
R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v3
R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v4.1			
R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v4.2			
R	F	T	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v4.3	
R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v4.4			
R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v5.1			
R	F	T	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v5.2	
R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v5.3			
R	F	T	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v5.4	
R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v5.5			
R	F	T	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v5.6	
R	F	T	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v6.1	
R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v6.2			
R	F	T	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v6.3	
R	F	T	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v6.4	
R	I	S	K	D	t	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v7			
R	I	S	K	D	N	S	K	N	T	V	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	T	T	A	D	Y	F	A	Y	W	Q	G	T	T	V	T	V	S	v8			

FIG. 6C

>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T	L78V	-	versión 1
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I			R71K	N73T		-	versión 2
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I			R71K			-	versión 2.1
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I						-	versión 3
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T	L78V	-	versión 4.1
>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I		F67L	R71K	N73T	L78V	-	versión 4.2
>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L		R71K	N73T	L78V	-	versión 4.3
>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T		-	versión 4.4
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I		F67L	R71K	N73T	L78V	-	versión 5.1
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I	V48L		R71K	N73T	L78V	-	versión 5.2
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T		-	versión 5.3
>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I			R71K	N73T	L78V	-	versión 5.4
>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I		F67L	R71K	N73T		-	versión 5.5
>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L		R71K	N73T		-	versión 5.6
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I			R71K	N73T	L78V	-	versión 6.1
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I		F67L	R71K	N73T		-	versión 6.2
>diseño de vh	A24F		F29L	V37I	V48L		R71K	N73T		-	versión 6.3
>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I			R71K	N73T		-	versión 6.4
>diseño de vh	A24F		F29L		V48L	F67L	R71K	N73T	L78V	-	versión 7
>diseño de vh	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T	L78V	-	versión 8

FIG. 7

Ensayo de unión de A β (1-42)
ch12A11 vs h12A11 v1 vs. h12a11v2, v2.1, v3

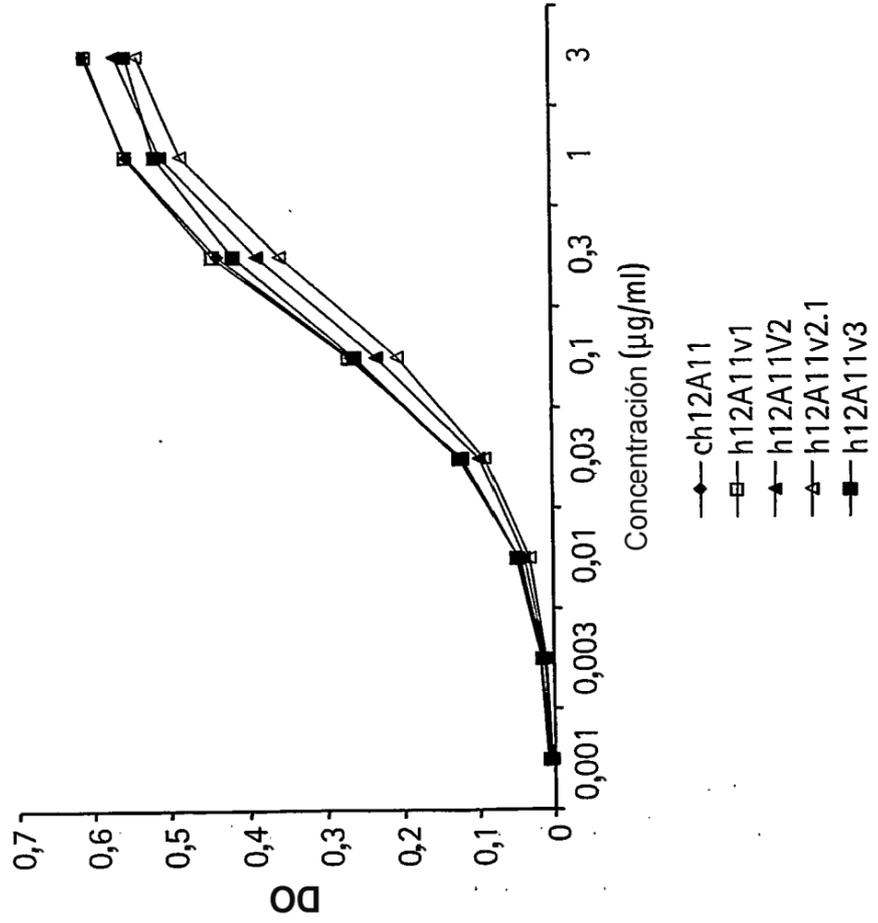


FIG. 8

Competición 12A11
12A11 mcg2a vs. ch12A11 vs. h12A11 v1

