

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 541**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03711559 .9**
96 Fecha de presentación: **12.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1554311**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2005**

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

30 Prioridad:
12.03.2002 US 363751 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
**JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
(50.0%)
2nd Floor, Treasury Building Lower Grand Canal
Street
Dublin 2, IE y
WYETH LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:
**BASI, GURIQ y
SALDANHA, JOSE**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

ES 2 389 541 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados que reconocen péptido beta-amiloide

Antecedentes de la invención

5 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que produce demencia senil. Véase generalmente 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 líneas generales, la enfermedad se clasifica en dos categorías: aparición tardía, que se produce en la tercera edad (+ 65 años) y aparición temprana, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre 35 y 60 años. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en casos que empiezan en 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 microtúbulos asociados a la proteína tau que consisten en dos filamentos retorcidos el uno alrededor del otro en pares. Las placas seniles (es decir, placas amiloides) son áreas de neuropilo desorganizado de hasta 150 μm a través de depósitos de amiloide extracelulares en el centro que son visibles por análisis microscópico de secciones de tejido de cerebro. La acumulación de placas amiloides dentro del cerebro también está asociada a síndrome de Down y otros trastornos cognitivos.

El principal constituyente de las placas es un péptido llamado péptido A β o β -amiloide. El péptido A β es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de una proteína llamada glucoproteína transmembrana mayor denominada proteína precursora del amiloide (APP). Como resultado del procesamiento proteolítico de la APP por diferentes enzimas secretasas, el A β se encuentra principalmente en tanto una forma corta, 40 aminoácidos de longitud, como en una forma larga, que oscila de 42-43 aminoácidos de longitud. Parte del dominio transmembrana hidrófobo de la APP se encuentra en el extremo carboxi 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 eventualmente a muerte celular neuronal. Los síntomas físicos asociados a este tipo de deterioro neural caracterizan la enfermedad de Alzheimer.

Varias mutaciones dentro de la proteína APP guardan relación con la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Véanse, 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 mutación doble que cambia lisinas⁵⁹⁵-metioninas⁵⁹⁶ a asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶). Se cree que tales mutaciones producen enfermedad de Alzheimer por procesamiento elevado o alterado de APP a A β , particularmente procesamiento de APP a cantidades elevadas 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 presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento de APP para generar cantidades elevadas de la forma larga de A β (véase Hardy, TINS 20: 154 (1997)).

Se han usado satisfactoriamente modelos de ratón para determinar la significancia de placas amiloides en Alzheimer (Games y col., anteriormente, Johnson-Wood y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550 (1997)). En particular, cuando a ratones transgénicos PDAPP (que expresan una forma mutante de APP humana y desarrollan enfermedad de Alzheimer a una edad joven) se les inyecta la forma larga de A β , muestran tanto una disminución en la progresión de Alzheimer como un aumento en los títulos de anticuerpos para el péptido A β (Schenk y col., Nature 400, 173 (1999)). Las observaciones tratadas anteriormente indican que A β , particularmente en su forma larga, es un elemento causante en enfermedad de Alzheimer.

El documento WO 01/62801 describe un procedimiento para tratar afecciones caracterizadas por la formación de placas amiloides tanto profilácticamente como terapéuticamente. El procedimiento emplea anticuerpos humanizados que secuestran péptido A β soluble de líquidos biológicos humanos o que preferentemente se unen específicamente a un epítipo contenido dentro de la posición 13-28 del péptido A β .

El documento EP 0921189 describe animales transgénicos, especialmente ratones, que expresan constitutivamente una molécula de tipo anticuerpo codificada por el transgén y que tienen una región constante de la cadena pesada de IgE y es específica para un antígeno pre-definido. Los animales transgénicos proporcionan una reacción alérgica para ese antígeno sin sensibilización previa y son útiles en modelos de alergia.

El documento WO 02/46237 describe agentes y procedimientos para el tratamiento de enfermedades asociadas a depósitos de amiloide de A β en el cerebro de un paciente. Agentes preferidos incluyen anticuerpos humanizados.

El documento WO 02/21141 describe la detección, el tratamiento o la prevención de amiloidosis o enfermedades asociadas a amiloide que incluyen procedimientos y composiciones que comprenden vacunas terapéuticas, antisueros y construcciones moleculares que comprenden vectores de expresión y proteínas de fusión codificadas en su interior.

El documento WO 02/088307 describe formas humanizadas del anticuerpo de ratón 10D5 que retienen las propiedades de unión de 10D5 de ratón. También se desvelan procedimientos para preparar el anticuerpo

humanizado y productos intermedios para preparar el anticuerpo humanizado, junto con procedimientos de uso del anticuerpo humanizado para tratar o prevenir síntomas o patología, o ambos, que están asociados a síndrome de Down o enfermedad pre-clínica o clínica de Alzheimer o angiopatía amiloide cerebral.

5 El documento WO 00/72880 describe agentes y procedimientos para el tratamiento de enfermedades asociadas a depósitos de amiloide de A β en el cerebro de un paciente. Tales procedimientos implican administrar agentes que inducen una respuesta inmunogénica beneficiosa contra el depósito de amiloide. Los procedimientos son útiles para el tratamiento profiláctico y terapéutico de enfermedad de Alzheimer. Agentes preferidos incluyen fragmentos del extremo N de A β y anticuerpos que se unen al mismo.

10 Por consiguiente, existe la necesidad de nuevas terapias y reactivos para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en particular terapias y reactivos que puedan efectuar un beneficio terapéutico a dosis fisiológica (por ejemplo, no tóxica).

Resumen de la invención

15 La presente invención muestra 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, al menos en parte, en la identificación y caracterización de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al péptido A β y es eficaz en la reducción de la carga de placas y/o en la reducción de la distrofia neurítica asociada a trastornos amiloidogénicos. El análisis estructural y funcional de este anticuerpo conduce al diseño de diversos anticuerpos humanizados para uso profiláctico y/o terapéutico. En particular, la invención muestra humanización de las regiones variables de este anticuerpo y, por consiguiente, proporciona
20 inmunoglobulina o cadenas de anticuerpos humanizados, inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados intactos e inmunoglobulina funcional o fragmentos de anticuerpos, en particular fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo mostrado.

También se desvelan polipéptidos que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo monoclonal mostrado, ya que son reactivos de polinucleótido, vectores y células huésped adecuadas
25 para codificar dichos polipéptidos.

Se desvelan procedimientos de tratamiento de enfermedades o trastornos amiloidogénicos (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), ya que son composiciones farmacéuticas y kits para su uso en tales aplicaciones.

También se muestran procedimientos de identificación de residuos dentro de los anticuerpos monoclonales mostrados que son importantes para la apropiada función inmunológica y para identificar residuos que son
30 aceptados para sustitución en el diseño de anticuerpos humanizados que tienen afinidades de unión mejoradas y/o inmunogenicidad reducida cuando se usan como reactivos terapéuticos.

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

Breve descripción de los dibujos

35 La *Figura 1A-B* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpos 12B4 de ratón (péptido maduro), 12B4 humanizados (péptido maduro, SEC ID N°: 6), Kabat ID 005036 (péptido maduro, SEC ID N°: 32) y A19 de la línea germinal (X63397, péptido maduro, SEC ID N°: 30). Las regiones CDR están punteadas y subrayadas por encima. La única retromutación de un residuo humano \rightarrow ratón se indica por el asterisco. La importancia de los residuos sombreados se muestra en la leyenda.
40 Numerados a partir de la primera metionina, no numeración de Kabat.

La *Figura 2A-B* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpos 12B4 de ratón (péptido maduro), 12B4 humanizados (versión 1) (péptido maduro, SEC ID N°: 8), Kabat ID 000333 (péptido maduro, SEC ID N°: 34) y VH4-39 y VH4-61 de la línea germinal (péptidos maduros, SEC ID N°: 38 y 36, respectivamente). La anotación es la misma que para la Figura 1. Numerados a partir de la
45 primera metionina, no numeración de Kabat.

La *Figura 3A-D* representa la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos para 12B4VLv1 humanizado en comparación con 12B4VL quimérico (secuencias de la región variable idénticas como 12B4VL murino, SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente); secuencias de A19 de la línea germinal (SEC ID N°: 29 y 30, respectivamente); e ID de Kabid 005036 (SEC ID N°: 31 y 32, respectivamente).
50

La *Figura 4A-D* representa la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos para 12B4VHv1 humanizado en comparación con 12B4VH quimérico (secuencias de la región variable idénticas como 12B4VH murino, SEC ID N°: 3 y 4, respectivamente); Kabat ID 000333 (SEC ID N°: 33 y 34, respectivamente); y VH4-61 de la línea germinal (SEC ID N°: 35 y 36, respectivamente).
55

La *Figura 5* representa gráficamente los resultados de ELISA de dos experimentos independientes que miden la unión de 12B4 quimérico, 3D6 y 3D6 a A13 quimérico (paneles A y B, respectivamente).

La *Figura 6* representa gráficamente la unión de ELISA competitiva que confirma la actividad funcional de 12B4 y 12B4 quimérico con respecto a 3D6, 3D6 quimérico, y 10D5. 12B4 quimérico (triángulos abiertos) compite con igual potencia con su homólogo murino no biotinilado (triángulos invertidos abiertos) por la unión de 12B4

murino biotinilado al péptido A β 1-42.

La *Figura 7* representa gráficamente un ensayo de fagocitosis *ex vivo* que prueba la capacidad de 12B4 quimérico, 3D6 e IgG1 humana para mediar en la captación de A β por células de la microglía sobre secciones de cerebro de PDAPP.

La *Figura 8* representa gráficamente los resultados de dos ensayos de fagocitosis *ex vivo* independientes (paneles A y B, respectivamente) que prueban la capacidad de 12B4 quimérico, 3D6 humanizado e IgG1 humana para mediar en la captación de A β por células de la microglía sobre secciones de cerebro de EA.

La *Figura 9* es una representación esquemática del ensamblaje mediado por PCR de 12B4 humanizado, versión 1. La *Figura 9A* representa el ensamblaje de las regiones VL. La *Figura 9B* representa el ensamblaje de las regiones VH.

Descripción detallada de la invención

La presente invención muestra nuevos reactivos inmunológicos y procedimientos para prevenir o tratar enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades amiloidogénicas. La invención se basa, al menos en parte, en la caracterización de una inmunoglobulina monoclonal, 12B4, eficaz en la unión a proteína beta-amiloide (A β) (por ejemplo, unión a A β soluble y agregada), mediación en 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 ligeras y pesadas variables de la inmunoglobulina 12B4 y la identificación de residuos importantes para la actividad e inmunogenicidad.

Se muestra que las inmunoglobulinas incluyen una cadena ligera variable y pesada variable de la inmunoglobulina monoclonal 12B4 descrita en el presente documento. Se muestran inmunoglobulinas preferidas, por ejemplo, inmunoglobulinas terapéuticas, que incluyen una cadena ligera variable humanizada y pesada variable humanizada. Cadenas ligeras variables y pesadas variables preferidas incluyen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la inmunoglobulina 12B4 (por ejemplo, inmunoglobulina donante) y regiones estructurales variables sustancialmente de una inmunoglobulina aceptora humana. El término "sustancialmente de una inmunoglobulina aceptora humana" significa que la mayoría de los residuos de la región estructural clave son de la secuencia aceptora humana, permitiendo, sin embargo, la sustitución de residuos en ciertas posiciones con residuos seleccionados para mejorar la actividad de la inmunoglobulina humanizada (por ejemplo, alterar la actividad de forma que imite más estrechamente la actividad de la inmunoglobulina donante) o seleccionados para reducir la inmunogenicidad de la inmunoglobulina humanizada.

En una realización, la invención muestra una cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de 12B4 (es decir, incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena ligera expuestas como SEC ID N°: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena pesada expuestas como SEC ID N°: 4), e incluye una región estructural variable sustancialmente de una secuencia de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, a condición de que al menos un residuo del residuo de la región estructural esté retromutado a un residuo murino correspondiente, en el que dicha retromutación no afecta sustancialmente la capacidad de la cadena para dirigir la unión a A β .

En otra realización, la invención muestra una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de 12B4 (por ejemplo, incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena ligera expuestas como SEC ID N°: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena pesada expuestas como SEC ID N°: 4), e incluye una región estructural variable sustancialmente de una secuencia de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, a condición de que al menos un residuo de la región estructural esté sustituido con el residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de la región variable de la cadena ligera o pesada de 12B4 de ratón, en el que el residuo de la región estructural está seleccionado del grupo que consiste en (a) un residuo que se une no covalentemente a antígeno directamente; (b) un residuo adyacente a una CDR; (c) un residuo de interacción con CDR (por ejemplo, identificado modelando la cadena ligera o pesada en la estructura resuelta de una cadena de inmunoglobulina conocida homóloga); y (d) un residuo que participa en la interfase VL-VH.

En otra realización, la invención muestra una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye CDR de la región variable de 12B4 y regiones estructurales variables de una secuencia de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, a condición de que al menos un residuo de la región estructural esté sustituido con el residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de la región variable de la cadena ligera o pesada de 12B4 de ratón, en el que el residuo de la región estructural es un residuo que puede afectar la conformación o función de la región variable de la cadena ligera como se identifica por análisis de un modelo tridimensional de la región variable, por ejemplo, un residuo que puede interactuar con antígeno, un residuo proximal al sitio de unión a antígeno, un residuo que puede interactuar con una CDR, un residuo adyacente a una CDR, un residuo dentro de 6 Å de un residuo de CDR, un residuo canónico, un residuo de zona vernier, un residuo de acondicionamiento entre cadenas, un residuo inusual, o un residuo de sitio de glucosilación sobre la superficie del modelo estructural.

En otra realización, la invención muestra, además de las sustituciones descritas anteriormente, una sustitución de al menos un residuo humano raro de la región estructural. Por ejemplo, un residuo raro puede estar sustituido con un residuo de aminoácido que es común para las secuencias de la cadena variable humana en esa posición. Alternativamente, un residuo raro puede estar sustituido con un residuo de aminoácido correspondiente de una secuencia de la cadena variable de la línea germinal homóloga.

En otra realización, la invención muestra 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. La inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno se une (por ejemplo, se une específicamente) tanto a péptido beta-amiloide (A β) soluble como a A β agregado. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno media en la fagocitosis (por ejemplo, induce fagocitosis) del 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 tanto la carga de péptido beta-amiloide (A β) como la distrofia neurítica en un sujeto.

En otra realización, la invención muestra inmunoglobulinas quiméricas que incluyen regiones variables de 12B4 (por ejemplo, las secuencias de la región variable expuestas como SEC ID N $^{\circ}$: 2 o SEC ID N $^{\circ}$: 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 aptas para uso en procedimientos terapéuticos que tienen como objetivo prevenir o tratar enfermedades amiloidogénicas. En una realización, la invención se refiere a 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 muestra composiciones farmacéuticas que incluyen una inmunoglobulina humanizada como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéutico. También se muestran moléculas de ácidos nucleicos aisladas, vectores y células huésped para producir las inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina o cadenas descritas en el presente documento, además de procedimientos para producir dichas inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulina o cadenas de inmunoglobulina.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para identificar residuos de 12B4 aceptados para la sustitución cuando se produce una inmunoglobulina humanizada 12B4, respectivamente. Por ejemplo, un procedimiento para identificar residuos de la región estructural variable aceptados para la sustitución implica modelar la estructura tridimensional de una región variable de 12B4 en una estructura de inmunoglobulina homóloga resuelta y analizar dicho modelo para residuos que pueden afectar la conformación o función de la región variable de la inmunoglobulina 12B4, de forma que se identifican residuos aceptados para la sustitución. La invención muestra adicionalmente el uso de la secuencia de la región variable expuesta como SEC ID N $^{\circ}$: 2 o SEC ID N $^{\circ}$: 4, o cualquier porción de la misma, en la producción de una imagen tridimensional de una inmunoglobulina 12B4, cadena de inmunoglobulina 12B4, o dominio de la misma.

La presente invención muestra adicionalmente inmunoglobulinas que tienen función efectora alterada, tal como la capacidad para unirse a moléculas efectoras, por ejemplo, complemento o un receptor sobre 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 residuo de aminoácido en la región Fc ha sido sustituido con un residuo diferente o cadena lateral. En una realización, la inmunoglobulina modificada es de la clase IgG, comprende al menos una sustitución de residuo de aminoácido en la región Fc de forma que la inmunoglobulina tiene una función efectora alterada, por ejemplo, en comparación con una inmunoglobulina sin modificar. En realizaciones particulares, la inmunoglobulina de la invención tiene una función efectora alterada de forma que es menos inmunogénica (por ejemplo, no provoca actividad de células efectoras no deseada, lisis o unión a complemento), tiene propiedades de eliminación de amiloide mejoradas 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 que van a usarse en lo sucesivo.

El término "inmunoglobulina" o "anticuerpo" (usados indistintamente en el presente documento) se refieren a una proteína que tiene una estructura de cuatro cadenas de polipéptidos básica que consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro entre cadenas, que tiene la capacidad para unirse específicamente a antígeno. El término "inmunoglobulina monocatenaria" o "anticuerpo monocatenario" (usados indistintamente en el presente documento) se refieren a una proteína que tiene una estructura de dos cadenas de polipéptidos que consiste en una cadena pesada y una ligera, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por ligadores de péptido entre cadenas, 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 de péptidos (por ejemplo, que comprende 3 a 4 bucles de péptidos)

estabilizada, por ejemplo, por hoja plegada β y/o enlace disulfuro entre cadenas. Los dominios se denominan adicionalmente en el presente documento "constantes" o "variables" basándose en la ausencia relativa de variación de secuencias dentro de los dominios de diversos miembros de clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de diversos miembros de clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de anticuerpos o polipéptidos se denominan frecuentemente indistintamente en la materia "regiones" de anticuerpos o polipéptidos. Los dominios "constantes" de una cadena ligera del anticuerpo se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena ligera", "dominios constantes de la cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de una cadena pesada del anticuerpo se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena pesada", "dominios constantes de la cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de una cadena ligera del anticuerpo se denominan indistintamente "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de la cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de una cadena pesada del anticuerpo se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena pesada", "dominios constantes de la cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH".

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), además de partes o porciones más discretas de dichas cadenas o dominios. Por ejemplo, cadenas ligeras y pesadas o dominios variables de la cadena ligera y pesada incluyen "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" intercaladas entre "regiones estructurales" o "FR", como se define en el presente documento.

Las inmunoglobulinas o 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 residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse por tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también pueden obtenerse por medios recombinantes. Fragmentos a modo de ejemplo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, Fabc y/o Fv. El término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a antígeno o compete con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivaron) por la 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, el término "conformación de cadena ligera (o pesada)" se refiere a la estructura terciaria de una región variable de la cadena ligera (o pesada) y el término "conformación de anticuerpo" o "conformación de fragmento de anticuerpo" se refiere a la estructura terciaria de un anticuerpo o fragmento del mismo.

"Unión específica" de un anticuerpo significa que el anticuerpo presenta afinidad apreciable por antígeno o un epítipo preferido y, preferentemente, no presenta reactividad cruzada significativa. Unión "apreciable" o preferida incluye unión con una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M⁻¹ o 10^{10} M⁻¹. Son más preferidas afinidades superiores a 10^7 M⁻¹, preferentemente superiores a 10^8 M⁻¹. Valores intermedios de aquellos expuestos en el presente documento también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención y una afinidad de unión preferida puede indicarse como un intervalo de afinidades, por ejemplo, 10^6 a 10^{10} M⁻¹, preferentemente 10^7 a 10^{10} M⁻¹, más preferentemente 10^8 a 10^{10} M⁻¹. Un anticuerpo que "no presenta reactividad cruzada significativa" es uno que no se unirá apreciablemente a una entidad no deseable (por ejemplo, una entidad proteínica no deseable). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a A β se unirá apreciablemente a A β , pero no reaccionará significativamente con proteínas o péptidos no A β (por ejemplo, proteínas o péptidos no A β incluidos en placas). Por ejemplo, un anticuerpo específico para un epítipo preferido no reaccionará significativamente de forma cruzada con epítopos remotos en la misma proteína o péptido. La unión específica puede determinarse según cualquier medio reconocido en la materia para determinar tal unión. Preferentemente, la unión específica se determina según análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

Los fragmentos de unión se producen por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab)₂, Fabc, Fv, cadenas individuales y anticuerpos monocatenarios. Aparte de inmunoglobulinas o anticuerpos "bienespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que una inmunoglobulina o anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un "anticuerpo bienespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos pueden producirse mediante una variedad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véanse, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

El término "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizada" (es decir, una "cadena ligera de la inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de la 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 estructural variable sustancialmente de una

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

- 5 región variable que incluye una región estructural variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.
- 10 El término "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que, cuando se alinea con una secuencia amino de inmunoglobulina o anticuerpo humano para fines de comparación, la región comparte al menos el 80-90 %, preferentemente al menos el 90-95 %, más preferentemente al menos el 95-99 % de identidad (es decir, identidad de secuencias local) con la secuencia de región estructural o
- 15 región constante humana, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de la secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal, retromutaciones y similares. La introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de la secuencia consenso, sustituciones de la línea germinal, retromutaciones y similares se denomina frecuentemente "optimización" de un anticuerpo humanizado o cadena. El término "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano" o "sustancialmente no humano" significa que
- 20 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 el 99 % idéntica a la de un organismo no humano, por ejemplo, un mamífero no humano.

Por consiguiente, todas las regiones o residuos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o de anticuerpo humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las regiones o residuos correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. El término

- 25 "región correspondiente" o "residuo correspondiente" se refiere a una región o residuo sobre una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos que ocupa la misma posición (es decir, equivalente) que una región o residuo sobre una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos, cuando la primera y segunda secuencias están óptimamente alineadas para los fines de comparación.

El término "identidad significativa" significa que dos secuencias de polipéptidos, cuando están óptimamente alineadas, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 50-60 % de identidad de secuencias, preferentemente al menos el 60-70 % de identidad de secuencias, más preferentemente al menos el 70-80 % de identidad de secuencias, más preferentemente al menos el 80-90 % de identidad, incluso más preferentemente al menos el 90-95 % de identidad, e incluso más preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencias o más (por ejemplo, el 99 % de identidad de secuencias o más). El término

- 30 "identidad sustancial" significa que dos secuencias de polipéptidos, cuando están óptimamente alineadas, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 80-90 % de identidad de secuencias, preferentemente al menos el 90-95 % de identidad de secuencias, y más preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencias o más (por ejemplo, el 99 % de identidad de secuencias o más). Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa de secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias. Si se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se entran en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan parámetro del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencias para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia basándose en los parámetros de programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el 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 la búsqueda por comparación del procedimiento de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones

- 45 computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual (véase generalmente Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). El software para realizar los análisis de BLAST está públicamente disponible por el Centro nacional para información biotecnológica (públicamente accesible por el servidor de internet del Instituto nacional de la salud NCBI). Normalmente pueden usarse parámetros de programa por defecto para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden usarse parámetros personalizados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas se diferencian por sustituciones de aminoácidos conservativas. Para los fines de clasificar sustituciones de aminoácidos como aminoácidos conservativos o no conservativos se agrupan del siguiente modo: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV

- 60

(cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (orientación de cadenas que influye en los residuos): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

- 5 Preferentemente, las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados se unen a antígeno con una afinidad que está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la del anticuerpo no humanizado correspondiente. Por ejemplo, si el anticuerpo no humanizado tiene una afinidad de unión de 10^9 M^{-1} , los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de unión de al menos $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o 10^9 M^{-1} . Cuando se describen las propiedades de unión de una cadena de inmunoglobulina o de 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 la capacidad de una cadena pesada o ligera para dirigir la unión a antígeno si afecta (por ejemplo, disminuye) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena por 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 que carece de dicha mutación. Una mutación “no afecta sustancialmente (por ejemplo, disminuye) la capacidad de una cadena para dirigir la unión a antígeno” si afecta (por ejemplo, disminuye) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena sólo un factor de dos, tres o cuatro de la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación.

El término “inmunoglobulina quimérica” o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables se derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes se derivan de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos pueden construirse, por ejemplo, por ingeniería genética a partir de fragmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Los términos “inmunoglobulina humanizada” o “anticuerpo humanizado” no pretenden englobar inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos como se define más adelante. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados sean quiméricos en su construcción (es decir, comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden residuos de CDR donantes y residuos de la región estructural aceptores) no encontrados en inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el presente documento.

- 30 Un “antígeno” es una entidad (por ejemplo, una entidad o péptido proteináceo) con el que un anticuerpo se une específicamente.

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

Los anticuerpos que reconocen el mismo epítope pueden identificarse en un simple inmunoensayo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina en prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como A β . Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competencia tipo sándwich (véase Stahli y col., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland y col., J. Immunol. 137:3614 (1986)); ensayo de marca directa en fase sólida, ensayo de tipo sándwich de marca directa en fase sólida (véase Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marca directa en fase sólida usando marca de I-125 (véase Morel y col., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung y col., Virology 176:546 (1990)); y RIA de marca directa (Moldenhauer y col., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)). Normalmente, un ensayo tal implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Normalmente, cuando un anticuerpo de competencia está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común al menos el 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % o más.

- 60 Un epítope también es reconocido por células inmunológicas, por ejemplo, linfocitos B y/o linfocitos T. El reconocimiento celular de un epítope puede determinarse por ensayos *in vitro* que miden la proliferación

dependiente de antígeno, como se ha determinado por incorporación de ³H-timidina, por secreción de citocina, por secreción de anticuerpo o por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos).

Los epítopes o determinantes antigénicos pueden encontrarse dentro de la proteína precursora del amiloide (APP) humana, pero aquellos de la invención se encuentran dentro del péptido Aβ de APP. Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. Los aminoácidos dentro de APP son números asignados según la secuencia de la isoforma APP⁷⁷⁰ (véase, por ejemplo, el n° de acceso de GenBank P05067). El péptido Aβ (también denominado el presente documento péptido beta-amiloide y A-beta) es un fragmento interno de aproximadamente 4 kDa de 39-43 aminoácidos de APP (Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 y Aβ43). Aβ40, por ejemplo, consiste en los residuos 672-711 de APP y Aβ42 consiste en los residuos 673-713 de APP. Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas secretadas *in vivo* o *in situ*, Aβ se encuentra en tanto una "forma corta", 40 aminoácidos de longitud, como una "forma larga", que oscila de 42-43 aminoácidos de longitud. El epítipo o determinante antigénico, como se describe en el presente documento, se localiza dentro del extremo N del péptido Aβ de los residuos 3-7 de Aβ42. Epítipes preferidos o determinantes antigénicos adicionales incluyen los residuos 2-4, 5, 6, 7 de Aβ, residuos 3-5, 6, 7 de Aβ o residuos 4-7 de Aβ42. Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítipo dentro de residuos especificados, por ejemplo, 3-7 de Aβ, lo que significa es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los residuos especificados (es decir, 3-7 de Aβ). Un anticuerpo tal no se pone necesariamente en contacto con cualquier residuo dentro de 3-7 de Aβ. Ni ninguna sustitución única de aminoácidos ni delección en 3-7 de Aβ afecta necesariamente significativamente la afinidad de unión.

El término "enfermedad amiloidogénica" incluye cualquier enfermedad asociada a (o producida por) formación o deposición de fibrillas de amiloide insolubles. Enfermedades amiloidogénicas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis sistémica, enfermedad de Alzheimer, diabetes de aparición en la madurez, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia fronto-temporal y las encefalopatías espongiiformes transmisibles relacionadas con priones (kuru y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en seres humanos y encefalopatía espongiiforme ovina y BSE en ovejas y ganado vacuno, respectivamente). Diferentes enfermedades amiloidogénicas se definen o caracterizan por la naturaleza del componente de polipéptido de las fibrillas depositadas. Por ejemplo, en sujetos o pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer, la proteína β-amiloide (por ejemplo, proteína β-amiloide natural, variante o truncada) es el componente de polipéptido caracterizador del depósito de amiloide. Por consiguiente, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una "enfermedad caracterizada por depósitos de Aβ" o una "enfermedad asociada a depósitos de Aβ", por ejemplo, en el cerebro de un sujeto o paciente. Los términos "proteína β-amiloide", "péptido β-amiloide", "β-amiloide", "Aβ" y "péptido Aβ" se usan indistintamente en el presente documento.

Un "agente inmunogénico" o "inmunogén" puede inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo en la administración a un mamífero, opcionalmente conjuntamente 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, superar o afectar la enfermedad, los síntomas de enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

El término "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término "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. Cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y del estado general del sistema inmunitario del propio paciente.

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

Aβ "soluble" o "disociado" se refiere al polipéptido Aβ no agregante o desagregado que incluye polipéptido Aβ soluble monomérico, además de soluble oligomérico (por ejemplo, dímeros, trímeros de Aβ soluble y similares). Aβ "insoluble" se refiere al polipéptido Aβ agregante, por ejemplo, Aβ mantenido junto por enlaces no covalentes. Se cree que Aβ (por ejemplo, Aβ42) se agrega, al menos en parte, debido a la presencia de residuos hidrófobos en el extremo C del péptido (parte del dominio transmembrana de APP). Aβ soluble puede encontrarse *in vivo* en líquidos biológicos tales como líquido cefalorraquídeo y/o suero. Alternativamente, Aβ soluble puede prepararse disolviendo péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La disolución resultante se centrifuga (por ejemplo, a 14.000 x g, 4 °C, 10 minutos) para eliminar cualquier partícula insoluble.

El término "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 complemento y/o receptores de Fc, que pueden controlar varias funciones inmunitarias del anticuerpo tal como actividad de células efectoras, lisis, actividad mediada por complemento, eliminación de anticuerpo y semivida del anticuerpo.

El término “molécula efectora” se refiere a una molécula que puede unirse a la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) que incluye, pero no se limita a, una proteína del complemento o un receptor de Fc.

5 El término “célula efectora” se refiere a una célula que normalmente puede unirse a la porción Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) por un receptor de Fc expresado sobre la superficie de la célula efectora que incluye, pero no se limita a, linfocitos, por ejemplo, células presentadoras de antígeno y linfocitos T.

El término “región Fc” se refiere a una región del extremo C de un anticuerpo IgG, en particular la región del extremo C de la(s) cadena(s) pesada(s) de dicho anticuerpo IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, una región Fc se define normalmente como una extensión desde aproximadamente el residuo de aminoácido Cys226 al extremo carboxilo de una cadena(s) pesada(s) de IgG.

10 El término “Numeración de Kabat”, a menos que se establezca de otro modo, se define como la numeración de los residuos en, por ejemplo, un anticuerpo de la 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)), incorporado expresamente en el presente documento por referencia.

15 El término “receptor de Fc” o “FcR” se refiere a un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Receptores Fc típicos que se unen a una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyen, pero no se limitan a, receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores de Fc se revisan 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).

20 I. Reactivos inmunológicos y terapéuticos

Los reactivos inmunológicos y terapéuticos de la invención comprenden o consisten en una inmunoglobulina, o fragmento de unión a antígeno de la misma, como se define en el presente documento. Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígeno. La porción del extremo carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

30 Las cadenas ligeras se clasifican como tanto kappa como lambda y tienen aproximadamente 230 residuos de longitud. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ), o epsilon (ε), tienen aproximadamente 450-600 residuos de longitud y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Tanto las cadenas pesadas como ligeras están plegadas 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, 3 o cuatro bucles de péptidos estabilizados por hoja plegada β y un enlace disulfuro entre cadenas. 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 están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, también incluyendo la cadena pesada una región “D” de aproximadamente 10 más aminoácidos (véase generalmente Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989), Cap. 7, incorporado por referencia en su totalidad para todos los fines).

40 Las regiones variables de cada par de cadena 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. Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las cadenas que se producen naturalmente o las cadenas recombinantemente producidas pueden expresarse con una secuencia conductora que se elimina durante el procesamiento celular para producir una cadena madura. Las cadenas maduras también pueden producirse recombinantemente teniendo una secuencia conductora que se produce no naturalmente, 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 están alineadas por las regiones estructurales, permitiendo la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. “FR4” también se denomina en la materia la región D/J de la cadena pesada variable y la región J de la cadena ligera variable. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991). Una definición estructural alternativa se ha propuesto por Chothia y col., J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); y J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (en lo sucesivo denominado en conjunto “Chothia y col.” e incorporado por referencia en su totalidad para todos los fines).

A. Anticuerpos para A β

Los agentes terapéuticos de la invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente a A β . Anticuerpos preferidos son anticuerpos monoclonales. Tales anticuerpos se unen tanto a formas agregadas como a solubles de A β . Los anticuerpos usados en procedimientos terapéuticos preferentemente tienen una región constante intacta o al menos suficiente de la región constante para interaccionar con un receptor de Fc. Anticuerpos preferidos son aquellos eficaces en estimular la fagocitosis de A β mediada por Fc en placas. Se prefiere el isotipo IgG1 humano debido a que tiene la mayor afinidad de los isotipos humanos por el receptor FcRI sobre células fagocíticas (por ejemplo, sobre macrófagos residentes en el cerebro o células de la microglía). La IgG humana es el equivalente de IgG2a murina, siendo, por tanto, la última adecuada para probar la eficacia *in vivo* en modelos de animal (por ejemplo, ratón) de Alzheimer. También pueden usarse fragmentos biespecíficos Fab, en los que un brazo del anticuerpo tiene especificidad por A β y el otro por un receptor de Fc. Los anticuerpos preferidos se unen a A β con una afinidad de unión superior a (o igual a) aproximadamente 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ ó 10¹⁰ M⁻¹ (incluyendo afinidades intermedias de estos valores).

Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítoto específico dentro de A β que puede ser un epítoto conformacional o no conformacional. La eficacia profiláctica y terapéutica de los anticuerpos puede probarse usando los procedimientos del modelo de animal transgénico descritos en los ejemplos. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítoto dentro de los residuos 3-7 de A β (designándose 1 el primer residuo del extremo N de A β natural). En algunos procedimientos se usan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por diferentes epítopes, por ejemplo, un anticuerpo específico para un epítoto dentro de los residuos 3-7 de A β puede co-administrarse con un anticuerpo específico para un epítoto fuera de los residuos 3-7 de A β . Tales anticuerpos pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente. También puede usarse anticuerpos para componentes de amiloide distintos de A β (por ejemplo, administrarse o co-administrarse).

La especificidad por epítoto de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, formando una biblioteca de expresión en fago en la que diferentes miembros muestran diferentes subsecuencias de A β . Entonces, la biblioteca de expresión en fago está seleccionada para miembros que se unen específicamente a un anticuerpo en prueba. Se aísla una familia de secuencias. Normalmente, una familia tal contiene una secuencia de núcleo común, y longitudes variables de secuencias flanqueantes en diferentes miembros. La secuencia de núcleo más corta que muestra unión específica por el anticuerpo define el epítoto unido por el anticuerpo. Los anticuerpos también pueden probarse para especificidad por epítoto en un ensayo de competencia con un anticuerpo cuya especificidad por epítoto ya se ha determinado. Por ejemplo, los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 12B4 para unirse a A β se unen con el mismo epítoto o epítoto similar como 12B4, es decir, dentro de los residuos 3-7 de A β . El cribado de anticuerpos para la especificidad por epítoto es un factor pronóstico útil de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha determinado que se une a un epítoto dentro de los residuos 1-7 de A β es probable que sea eficaz en la prevención y el tratamiento de enfermedad de Alzheimer según las metodologías de la presente invención.

Los anticuerpos que se unen específicamente a un segmento preferido de A β sin unirse a otras regiones de A β tienen varias ventajas con respecto a los anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o sueros policlonales para A β intacto. Primero, para dosificaciones de masa igual, las dosificaciones de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una mayor dosificación molar de anticuerpos eficaces en eliminar placas amiloides. Segundo, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación contra depósitos de amiloide sin inducir una respuesta de eliminación contra polipéptido APP intacto, reduciéndose así los posibles efectos secundarios.

1. Producción de anticuerpos no humanos

La presente invención muestra anticuerpos no humanos, por ejemplo, anticuerpos que tienen especificidad por el epítoto de A β de la invención. Tales anticuerpos pueden usarse en la formulación de diversas composiciones terapéuticas de la invención o, preferentemente, proporcionan regiones determinantes de la complementariedad para la producción de anticuerpos humanizados o quiméricos (descritos en detalle más adelante). La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murinos, cobaya, primate, conejo o rata, puede llevarse a cabo, por ejemplo, inmunizando el animal con A β . También puede usarse un polipéptido más largo que comprende A β o un fragmento inmunogénico de A β o anticuerpos antiidiotípicos para un anticuerpo para A β . Véase Harlow & Lane, anteriormente, incorporado por referencia para todos los fines. Un inmunogén tal puede obtenerse a partir de una fuente natural, por síntesis de péptidos o por expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunogén puede administrarse fusionado o complejoado de otro modo con una proteína portadora, como se describe más adelante. Opcionalmente, el inmunogén puede administrarse con un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se administra conjuntamente con un antígeno, aumenta la respuesta inmunitaria al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmunitaria al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria por varios mecanismos que incluyen reclutamiento de linfocitos, estimulación de linfocitos B y/o T y estimulación de macrófagos. Pueden usarse varios tipos de adyuvante como se describe más adelante. Se prefiere adyuvante completo de Freund seguido de adyuvante incompleto para la inmunización de animales de laboratorio.

Normalmente se usan conejos o cobayas para preparar anticuerpos policlonales. La preparación a modo de ejemplo

de anticuerpos policlonales, por ejemplo, para la protección pasiva, puede realizarse del siguiente modo. 125 ratones no transgénicos se inmunizan con 100 µg de Aβ1-42, más adyuvante CFA/IFA, y se sacrifican a los 4-5 meses. Se recoge la sangre de los ratones inmunizados. La IgG se separa de otros componentes de la sangre. El anticuerpo específico para el inmunogén puede purificarse parcialmente por cromatografía de afinidad. Se obtiene un promedio de aproximadamente 0,5-1 mg de anticuerpo específico para inmunogén por ratón, dando un total de 60-120 mg.

Los ratones se usan normalmente para preparar anticuerpos monoclonales. Los monoclonales pueden prepararse contra un fragmento inyectando el fragmento o forma más larga de Aβ en un ratón, preparando hibridomas y cribando los hibridomas para un anticuerpo que se une específicamente a Aβ. Opcionalmente, los anticuerpos se criban para unirse a una región específica o fragmento deseado de Aβ sin unirse a otros fragmentos no solapantes de Aβ. El último cribado puede llevarse a cabo determinando la unión de un anticuerpo a 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 Western o ELISA. El fragmento más pequeño que muestra unión específica al anticuerpo define el epítipo del anticuerpo. Alternativamente, la especificidad por epítipo puede determinarse por un ensayo de competencia en el que un anticuerpo de prueba y de referencia compiten por la unión a Aβ. Si los anticuerpos de prueba y de referencia compiten, entonces se unen al mismo epítipo o epítopos suficientemente próximos, de tal forma que la unión de un anticuerpo interfiera con la unión del otro. El isotipo preferido para tales anticuerpos es el isotipo IgG2a de ratón o isotipo equivalente en otras especies. El isotipo IgG2a de ratón es el equivalente del isotipo IgG1 humana (por ejemplo, IgG1 humana).

2. Anticuerpos quiméricos y humanizados

La presente invención también muestra anticuerpos quiméricos y/o humanizados (es decir, inmunoglobulina quimérica y/o humanizada) específicos para el péptido beta-amiloide. Los anticuerpos quiméricos y/o humanizados tienen la misma especificidad y afinidad de unión o similar que un anticuerpo de ratón u otro no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado.

A. Producción de anticuerpos quiméricos

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo cuyos genes de la cadena ligera y pesada han sido contruidos, normalmente por ingeniería genética, a partir de segmentos del gen 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 humana. Por tanto, un anticuerpo quimérico típico es una proteína híbrida que consiste en el dominio V o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

B. Producción de anticuerpos humanizados

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una cadena que comprende residuos de la región estructural variable sustancialmente de una cadena de anticuerpo humano (denominado la inmunoglobulina o anticuerpo aceptor) y al menos una región determinante de la complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (denominado la inmunoglobulina o anticuerpo donante). Véanse 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 (incorporados por referencia en su totalidad para todos los fines). La(s) región (regiones) constante(s), si está(n) presente(s), también es (son) sustancialmente o enteramente de una inmunoglobulina humana.

Lo más probable es que la sustitución de CDR de ratón en una región estructural del dominio variable humano produzca la retención de su orientación espacial correcta si la región estructural del dominio variable humano adopta la misma conformación o similar a la de la región estructural variable de ratón a partir de la cual se originaron las CDR. Esto se logra obteniendo los dominios variables humanos de anticuerpos humanos cuyas secuencias de la región estructural presentan un alto grado de identidad de secuencias con los dominios de la región estructural variable murina de los que se derivaron las CDR. Las regiones estructurales variables de la cadena pesada y ligera pueden derivarse de las mismas secuencias de anticuerpos humanos o de secuencias de anticuerpos humanos diferentes. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos que se producen naturalmente o pueden ser las secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véanse Kettleborough y col., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger y col., Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter y col., documento WO 92/22653.

Habiendo identificado las regiones determinantes de la complementariedad de la inmunoglobulina donante murina e inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa es determinar qué residuos, si los hay, de estos componentes deberían estar sustituidos para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En general, la sustitución de residuos de aminoácidos humanos con murinos debería minimizarse debido a que la introducción de residuo murino aumenta el riesgo del anticuerpo de provocar una respuesta al anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) en seres humanos. Los procedimientos reconocidos en la materia de determinación de la respuesta inmunitaria pueden realizarse para monitorizar una respuesta HAMA en un paciente particular o durante

ensayos clínicos. A los pacientes a los que se les administró anticuerpos humanizados puede dárseles una evaluación de inmunogenicidad al principio y durante 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 para un experto en la materia, que incluye tecnología de resonancia de plasmones superficiales (BIACORE) y/o análisis de ELISA en fase sólida.

Ciertos aminoácidos de los residuos de la región estructural variable humana están seleccionados para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de CDR y/o unión a antígeno. La yuxtaposición no natural de regiones CDR murinas con región estructural variable humana puede producir limitaciones conformacionales no naturales que, a menos que se corrijan por la sustitución de ciertos residuos de aminoácidos, conducen a la pérdida de afinidad de unión.

La selección de residuos de aminoácidos para la sustitución se determina, en parte, por modelado informático. El hardware y software informático se describen en el presente documento para producir imágenes tridimensionales de moléculas de inmunoglobulina. En general, se producen modelos moleculares a partir de las estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o dominios de las mismas. Las cadenas que van a modelarse se comparan para la similitud de secuencias de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que muestran la mayor similitud de secuencias se seleccionan como puntos de partida para la construcción del modelo molecular. Las cadenas o dominios que comparte al menos el 50 % de identidad de secuencias se seleccionan para el modelado, y preferentemente aquellas que comparten al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de identidad de secuencias o más se seleccionan para el modelado. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas o dominios de inmunoglobulina que se modelan, y aquellos en la estructura de partida. Entonces, las estructuras modificadas se ensamblan en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina por minimización de energía y verificando que todos los átomos estén dentro de distancias apropiadas entre sí y que las longitudes y ángulos de enlace estén dentro de límites químicamente aceptables.

La selección de residuos de aminoácidos para la sustitución también puede determinarse, en parte, por examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, u observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, si un aminoácido se diferencia entre un residuo de la región estructural variable murina y un residuo de la región estructural variable humana seleccionada, el aminoácido de la región estructural humana debería estar normalmente sustituido con el aminoácido de la región estructural equivalente del anticuerpo de ratón si se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una no covalentemente al antígeno directamente,
- (2) sea adyacente a una región CDR,
- (3) interactúe de otro modo con una región CDR (por ejemplo, esté dentro de aproximadamente 3-6 Å de una región CDR como se ha determinado por modelado informático), o
- (4) participe en la interfase VL-VH.

Residuos que “se unen no covalentemente a antígeno directamente” incluyen aminoácidos en posiciones en regiones estructurales que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con aminoácidos sobre el antígeno según fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, por enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas y similares.

Las CDR y regiones estructurales son como se definen por Kabat y col. o Chothia y col., anteriormente. Cuando los residuos de la región estructural, como se definen por Kabat y col., anteriormente, constituyen residuos de bucles estructurales como se define por Chothia y col., anteriormente, los aminoácidos presentes en el anticuerpo de ratón pueden seleccionarse para la sustitución en el anticuerpo humanizado. Los residuos que son “adyacentes a una región CDR” incluyen residuos de aminoácidos 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 eligen del aceptor, distorsionen las CDR donantes y reduzcan la afinidad. Además, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno (Amit y col., Science, 233:747 (1986), que se incorpora en el presente documento por referencia) y puede desearse seleccionar estos aminoácidos del donante para mantener todos los contactos del antígeno que proporcionan afinidad en el anticuerpo original.

Residuos que “interaccionan de otro modo con una región CDR” incluyen aquellos que se determinan por análisis estructural secundario que están en una orientación espacial suficiente para afectar una región CDR. En una realización, los residuos que “interaccionan de otro modo con una región CDR” se identifican analizando un modelo tridimensional de la inmunoglobulina donante (por ejemplo, un modelo generado por ordenador). Un modelo tridimensional, normalmente del anticuerpo donante original, muestra que ciertos aminoácidos fuera de las CDR están próximos a las CDR y tienen una buena probabilidad de interactuar con aminoácidos en las CDR por puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En aquellas posiciones de aminoácidos puede seleccionarse el aminoácido de la inmunoglobulina donante en vez del aminoácido de la inmunoglobulina aceptor. Los aminoácidos según este criterio tendrán generalmente un átomo de la cadena lateral

dentro de aproximadamente 3 unidades de angstrom (Å) de algún átomo en las CDR y deben contener un átomo que interaccionaría con los átomos de CDR según fuerzas químicas establecidas tales como aquellas enumeradas anteriormente.

5 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 tanto, en el último caso, los núcleos deben estar dentro de aproximadamente 6 Å (3 Å más la suma de los radios de van der Waals) para los átomos que va a considerarse que pueden interaccionar. En muchos casos, los núcleos estarán separados de 4 ó 5 a 6 Å. En la determinación de si un aminoácido puede interactuar con CDR o no se prefiere no considerar los 8 últimos aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada como parte de las CDR, debido a que desde el punto de
10 vista de la estructura estos 8 aminoácidos se comportan más como parte de la región estructural.

Los aminoácidos que pueden interaccionar con aminoácidos en las CDR pueden identificarse de otra forma más. El área superficial accesible al disolvente de cada aminoácido de la región estructural se calcula de dos formas: (1) en el anticuerpo intacto, y (2) en una molécula hipotética que consiste en el anticuerpo con sus CDR eliminadas. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente 10 angstroms cuadrados o más muestra que el acceso del aminoácido de la región estructural al disolvente es al menos parcialmente bloqueado por las CDR y, por tanto, que el aminoácido está en contacto con las CDR. El área superficial 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), ambos de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia). Los aminoácidos de la región estructural también
15 pueden interaccionar ocasionalmente con las CDR indirectamente, afectando la conformación de otro aminoácido de la región estructural que a su vez está en contacto con las CDR.

Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en la región estructural pueden interaccionar con las CDR en muchos anticuerpos (Chothia y Lesk, anteriormente, Chothia y col., anteriormente y Tramontano y col., J. Mol. Biol. 215:175 (1990), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia). Notablemente 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 según Kabat) pueden interaccionar con las CDR en muchos anticuerpos. También es probable que los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada interaccionen con las CDR. En todas estas posiciones enumeradas se prefiere la elección del aminoácido donante en vez del aminoácido
25 aceptador (cuando se diferencian) para que esté en la inmunoglobulina humanizada. Por otra parte, algunas veces pueden elegirse ciertos residuos que pueden interaccionar con la región CDR, tal como los 5 primeros aminoácidos de la cadena ligera, de la inmunoglobulina aceptora sin pérdida de afinidad en la inmunoglobulina humanizada.

Los residuos que "participan en la interfase VL-VH" o "residuos de acondicionamiento" incluyen aquellos residuos en la interfase entre VL y VH como se definen, por ejemplo, por Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) o Chothia y col., anteriormente. Generalmente, residuos de acondicionamiento no usuales deberían ser
30 retenidos en el anticuerpo humanizado si se diferencian de aquellos en las regiones estructurales humanas.

En general, uno o más de los aminoácidos que satisfacen los criterios anteriores están sustituidos. En algunas realizaciones, todos o la mayoría de los aminoácidos que satisfacen los criterios anteriores están sustituidos. Ocasionalmente hay alguna ambigüedad sobre si un aminoácido particular cumple o no los criterios anteriores, y se producen inmunoglobulinas de variante alternativas, una de las cuales tiene sustitución particular, la otra no. Las inmunoglobulinas de variante alternativas así producidas pueden probarse en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento para la actividad deseada, y seleccionarse la inmunoglobulina preferida.
40

Normalmente, las regiones CDR en anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas, y más normalmente, idénticas a las regiones CDR correspondientes del anticuerpo donante. Aunque no es normalmente deseable, algunas veces es posible hacer una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de residuos de CDR sin afectar apreciablemente la afinidad de unión de la inmunoglobulina humanizada resultante. Por sustituciones conservativas está previsto combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.
45

Candidatos adicionales para la sustitución son aminoácidos de la región estructural humana aceptora que son inusuales o "raros" para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden estar sustituidos con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Por ejemplo, la sustitución puede ser deseable cuando el aminoácido en una región estructural humana de la inmunoglobulina aceptora sea raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante sea común para esa posición en secuencias de inmunoglobulina humana; o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina aceptora sea raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante también sea raro, con respecto a otras secuencias humanas. Estos criterios ayudan a garantizar que un aminoácido atípico en la región estructural humana no altere la estructura del anticuerpo. Además, el anticuerpo humanizado puede hacerse menos inmunogénico sustituyendo un aminoácido
50 aceptador humano inusual con un aminoácido del anticuerpo donante que parece ser típico para anticuerpos humanos.

El término "raro", como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que se produce en esa posición en

5 menos de aproximadamente el 20 %, pero normalmente en menos de aproximadamente el 10 % de las secuencias en una muestra de secuencias representativa, y el término “común”, como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que se produce en más de aproximadamente el 25 %, pero normalmente en más de aproximadamente el 50 % de las secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada humanas están respectivamente agrupadas en “subgrupos” de secuencias que son especialmente homólogas entre sí y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat y col., anteriormente). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es “raro” o “común” entre secuencias humanas, frecuentemente será preferible considerar sólo aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo que la secuencia aceptora.

10 Candidatos adicionales para la sustitución son aminoácidos de la región estructural humana aceptores que se identificarían como parte de una región CDR bajo la definición alternativa propuesta por Chothia y col., anteriormente. Candidatos adicionales para la sustitución son aminoácidos de la región estructural humana aceptores que se identificarían como parte de una región CDR bajo las definiciones de AbM y/o contacto.

15 Candidatos adicionales para la sustitución son residuos de la región estructural aceptores que se corresponden con un residuo de la región estructural donante raro o inusual. Residuos de la región estructural donantes raros o inusuales son aquellos que son raros o inusuales (como se define en el presente documento) para anticuerpos murinos en esa posición. Para anticuerpos murinos, el subgrupo puede determinarse según Kabat e identificarse las posiciones de residuos que se diferencian del consenso. Estas diferencias específicas del donante pueden señalar mutaciones somáticas en la secuencia murina que potencian la actividad. Los residuos inusuales que se predice que afectan la unión son retenidos, mientras que los residuos que se predice que no son importantes para la unión pueden estar sustituidos.

20 Candidatos adicionales para la sustitución son residuos de la línea no germinal que se producen en una región estructural aceptora. Por ejemplo, cuando una cadena de anticuerpoceptor (es decir, una cadena de anticuerpo humano que comparte identidad de secuencias significativa con la cadena de anticuerpo donante) está alineada con una cadena de anticuerpo de la línea germinal (que asimismo comparte identidad significativa de secuencias con la cadena donante), los residuos que no coinciden entre la región estructural de la cadena aceptora y la región estructural de la cadena de la línea germinal pueden estar sustituidos con residuos correspondientes de la secuencia de la línea germinal.

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

30 Los anticuerpos humanizados presentan preferentemente una afinidad de unión específica por antígeno de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 ó 10^{10} M^{-1} . Normalmente, el límite superior de la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados por antígeno está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la de la inmunoglobulina donante. Frecuentemente, el límite inferior de la afinidad de unión también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la de la inmunoglobulina donante. Alternativamente, la afinidad de unión puede compararse con la de un anticuerpo humanizado que no tiene sustituciones (por ejemplo, un anticuerpo que tiene CDR donantes y FRceptoras, pero no tiene sustituciones de FR). En tales casos, la unión del anticuerpo optimizado (con sustituciones) es preferentemente al menos dos a tres veces superior, o tres a cuatro veces superior, a la del anticuerpo sin sustituir. Para hacer comparaciones, la actividad de los diversos anticuerpos puede determinarse, por ejemplo, por ensayos BIACORE (es decir, resonancia de plasmones superficiales usando reactivos sin marcar) o de unión competitiva.

C. Producción de anticuerpos 12B4 humanizados

Una realización preferida de la presente invención muestra un anticuerpo humanizado para el extremo N de A β , 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 12B4. 12B4 es específico para el extremo N de A β y se ha mostrado que media en la fagocitosis (por ejemplo, induce fagocitosis) de placa amiloide. La clonación y secuenciación de ADNc que codifica las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 12B4 se describe en el Ejemplo I.

Secuencias de anticuerpos aceptores humanos adecuadas se identifican por comparaciones informáticas de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos

conocidos. La comparación se realiza por separado para cadenas pesadas y ligeras, pero los principios son similares para cada una. En particular, los dominios variables de anticuerpos humanos cuyas secuencias de la región estructural presentan un alto grado de identidad de secuencias con las regiones estructurales VL y VH murinas se identificaron por búsqueda consulta de la base de datos de Kabat usando BLAST de NCBI (públicamente accesible por el servidor de internet del Instituto nacional de la salud NCBI) con las secuencias de la región estructural murina respectiva. En una realización se seleccionan las secuenciasceptoras que comparten más de la identidad de secuencias con secuencias donantes murinas. Preferentemente se seleccionan las secuencias de anticuerposceptoras que comparten el 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más.

Una comparación informática de 12B4 reveló que la cadena ligera de 12B4 muestra la mayor identidad de secuencias con cadenas ligeras humanas del subtipo kappa II, y que la cadena pesada de 12B4 muestra la mayor identidad de secuencias con cadenas pesadas humanas del subtipo II, como se define por Kabat y col., anteriormente. Por tanto, las regiones estructurales humanas ligeras y pesadas se derivan preferentemente de anticuerpos humanos de estos subtipos, o de secuencias consenso de tales subtipos. Las regiones variables humanas de la cadena ligera preferidas que muestran la mayor identidad de secuencias con la región correspondiente de 12B4 son de un anticuerpo que tiene el número de ID de Kabat 005036. Las regiones variables humanas de la cadena pesada preferidas que muestran la mayor identidad de secuencias con la región correspondiente de 12B4 son de un anticuerpo que tiene el número de ID de Kabat 000333, un anticuerpo que tiene el nº de acceso de Genbank AAB35009, y un anticuerpo que tiene el nº de acceso de Genbank AAD53816, siendo más preferido el anticuerpo que tiene el número de ID de Kabat 000333.

A continuación se seleccionan los residuos para la sustitución del siguiente modo. Cuando un aminoácido se diferencia entre una región estructural variable de 12B4 y una región estructural variable humana equivalente, el aminoácido de la región estructural humana debe estar normalmente sustituido con el aminoácido de ratón equivalente si se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una no covalentemente a antígeno directamente,
- (2) sea adyacente a una región CDR, sea parte de una región CDR bajo la definición alternativa propuesta por Chothia y col., anteriormente, o interaccione de otro modo con una región CDR (por ejemplo, esté dentro de aproximadamente 3 Å de una región CDR), o
- (3) participe en la interfase VL-VH.

El modelado informático de las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 12B4, y la humanización del anticuerpo 12B4, se describen en el Ejemplo V. Brevemente, se genera un modelo tridimensional basado en las estructuras de anticuerpo murino más estrechamente resueltas para las cadenas pesadas y ligeras. El modelo se refina adicionalmente por una serie de etapas de minimización de energía para aliviar contactos atómicos no favorables y optimizar interacciones electrostáticas y de van der Waals.

La información estructural tridimensional para los anticuerpos descritos en el presente documento está públicamente disponible, por ejemplo, de la base de datos de proteínas (PDB) de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. La PDB está libremente accesible por internet y se describe por Berman y col. (2000) Nucleic Acids Research, 28:235. El modelado informático permite la identificación de residuos que interaccionan con CDR. El modelado informático de la estructura de 12B4 puede servir a su vez de un punto de partida para predecir la estructura tridimensional de un anticuerpo que contiene las regiones determinantes de la complementariedad de 12B4 sustituidas en estructuras de la región estructural humana. Pueden construirse modelos adicionales que representan la estructura a medida que se introducen otras sustituciones de aminoácidos.

En general se desea la sustitución de uno, la mayoría o todos los aminoácidos que satisfagan los criterios anteriores. Por consiguiente, los anticuerpos humanizados de la presente invención contendrán normalmente una sustitución de un residuo de la región estructural de la cadena ligera humana con un residuo de 12B4 correspondiente en al menos 1, 2, 3 o más de las posiciones elegidas. Los anticuerpos humanizados también contienen normalmente una sustitución de un residuo de la región estructural de la cadena pesada humana con un residuo de 12B4 correspondiente en al menos 1, 2, 3 o más de las posiciones elegidas.

Ocasionalmente, sin embargo, hay alguna ambigüedad sobre si un aminoácido particular cumple o no los criterios anteriores, y se producen inmunoglobulinas de variante alternativas, una de las cuales tiene sustitución particular, la otra no. En casos en los que la sustitución con un residuo murino introduciría un residuo que es raro en inmunoglobulinas humanas en una posición particular, puede desearse probar el anticuerpo para 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, ya que cabría esperar que provocara menos de una respuesta HAMA, como se describe en el presente documento.

Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos de la región estructural humana aceptora que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden estar sustituidos con aminoácidos de la posición equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas. Alternativamente, los aminoácidos de posiciones equivalentes en el 12B4 de ratón pueden introducirse en las regiones estructurales humanas cuando tales aminoácidos son típicos de inmunoglobulina humana en las posiciones equivalentes.

Otros candidatos para la sustitución son residuos de la línea no germinal que se producen en una región estructural. Realizando una comparación informática de 12B4 con secuencias de la línea germinal conocidas pueden identificarse secuencias de la línea germinal con el mayor grado de identidad de secuencias para la cadena pesada o ligera. El alineamiento de la región estructural y la secuencia de la línea germinal revelará qué residuos pueden seleccionarse para la sustitución con residuos de la línea germinal correspondientes. Los residuos que no coinciden entre una región estructural aceptora de la cadena ligera seleccionada y una de estas secuencias de la línea germinal podrían seleccionarse para la sustitución con el residuo de la línea germinal correspondiente.

La Tabla 1 resume el análisis de las secuencias de las regiones VH y VL de 12B4. Se exponen estructuras de ratón y humanas adicionales que pueden usarse para el modelado informático del anticuerpo 12B4 y anticuerpos humanos adicionales, además de las secuencias de la línea germinal que pueden usarse en la selección de sustituciones de aminoácidos. En la Tabla 1 también se exponen residuos raros de ratón. Los residuos de ratón se identifican comparando las secuencias de VL y/o VH donantes con las secuencias de otros miembros del subgrupo al que pertenecen las secuencias de VL y/o VH donantes (según Kabat) e identificando las posiciones de residuos que se diferencian del consenso. Estas diferencias específicas para donante pueden señalar mutaciones somáticas que potencian la actividad. Residuos inusuales o raros próximos al sitio de unión pueden posiblemente ponerse en contacto con el antígeno, haciendo que sea deseable retener el residuo de ratón. Sin embargo, si el residuo de ratón inusual no es importante para la unión, se prefiere el uso del residuo aceptor correspondiente ya que el residuo de ratón puede crear neoepítopes inmunogénicos en el anticuerpo humanizado. En la situación en la que un residuo inusual en la secuencia donante es en realidad un residuo común en la secuencia aceptora correspondiente, el residuo preferido es claramente el residuo aceptor.

Tabla 1. Resumen de la secuencia de la región V de 12B4

Cadena	VL	VH
Subgrupo de ratón	n	lb
Subgrupo humano	II	II
Aminoácidos raros (% de frecuencia)	K107 (0,542 %)	T3, I11, L12, F24, S41, N75, D83, A85
Clase canónica de Chothia	L1: ~ clase 4 [1 rmf] L2: clase 1 [1 lmk] L3: clase 1 [1 tet]	H1: clase 3 [1 ggi] H2: ~clase 1
Estructura resuelta de MAb de ratón más próxima	2PCP (2,2 Å)	1ETZ (2,6 Å)
Homología con molde de modelado	94 %	80 %
Sec de la región estructural humana	RABID 005036	1-KABID 000333 2-AAB35009/1F7 3-AAD53816
Ref de la línea germinal para Fr humana	A3/x12690 y A19/X63397	1: VH4-39/AB019439/ BAA75036.1 2: VH2-5/AB019440/ BAA75057.1

Las secuencias de ID de Kabat citadas en el presente documento están a disposición pública, por ejemplo, en la base de datos de Kabat del Departamento de ingeniería biomédica de la Universidad de Northwestern de Sequences of Proteins of Immunological Interest. La información estructural tridimensional para anticuerpos descrita en el presente documento está públicamente disponible, por ejemplo, de la base de datos de proteínas (PDB) de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. La PDB está libremente accesible por internet y se describe por Berman y col. (2000) Nucleic Acids Research, p235-242. Las secuencias de genes de la línea germinal citadas en el presente documento están públicamente disponibles, por ejemplo, de la base de datos de secuencias del Centro nacional para información biotecnológica (NCBI) en colecciones de genes V de la línea germinal de Igh, Ig kappa e Ig lambda (como una división de la Biblioteca nacional de medicina (NLM) en el Instituto nacional de la salud (NIH)). La búsqueda de homología de la base de datos "Ig Germline Genes" de NCBI se proporciona por BLAST™ de IgG.

En una realización preferida, un anticuerpo humanizado de la presente invención contiene (i) una cadena ligera que comprende un dominio variable que comprende CDR de VL de 12B4 murinas y una región estructural aceptora humana, teniendo la región estructural al menos un residuo sustituido con el residuo de 12B4 correspondiente y (ii) una cadena pesada que comprende CDR de VH de 12B4 y una región estructural aceptora humana, teniendo la región estructural al menos uno, preferentemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve residuos sustituidos con el residuo de 12B4 correspondiente, y, opcionalmente, al menos uno, preferentemente dos o tres residuos sustituidos con un residuo de la línea germinal humana correspondiente.

En otra realización preferida, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describe en el presente documento, y adicionalmente tiene al menos una (preferentemente dos, tres o cuatro) de las siguientes actividades: (1) se une a Aβ en placas (por ejemplo, tinción de placas de EA y/o PDAPP);

(2) se une a A β con dos a tres veces mayor afinidad de unión con respecto a 12B4 quimérico (por ejemplo, 12B4 que tiene secuencias de la región variable murina y secuencias de la región constante humana); (3) media en la fagocitosis de A β (por ejemplo, en un ensayo de fagocitosis *ex vivo*, como se describe en el presente documento); y (4) 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 preferida, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describen en el presente documento, se une a A β de un modo o con una afinidad suficiente para provocar al menos uno de los siguiente efectos *in vivo*: (1) reducen la carga de placas de A β ; (2) previenen la formación de placas; (3) reducen los niveles de A β soluble; (4) reducen la patología neurítica asociada a un trastorno amiloidogénico; (5) reducen o mejoran al menos un síntoma fisiológico asociado a un trastorno amiloidogénico; y/o (6) mejoran la función cognitiva.

Un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describen en el presente documento, y se une específicamente a un epítoto que comprende los residuos 3-7 de A β .

En otra realización preferida, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describen en el presente documento, se une a un epítoto del extremo N dentro de A β (por ejemplo, se une a un epítoto dentro de los aminoácidos 3-7 de A β) y puede reducir (1) niveles de péptidos A β ; (2) carga de placas de A β ; y (3) la carga neurítica o distrofia neurítica asociada a un trastorno amiloidogénico.

Las actividades descritas anteriormente pueden determinarse cuando uno cualquiera de una variedad de ensayos descritos en el presente documento o en la materia (por ejemplo, ensayos de unión, ensayos de fagocitosis, etc.). Las actividades pueden ensayarse tanto *in vivo* (por ejemplo, usando componentes de ensayo marcados y/o técnicas de obtención de imágenes) como *in vitro* (por ejemplo, usando muestras o especímenes derivados de un sujeto). Las actividades pueden ensayarse tanto directamente como indirectamente. En ciertas realizaciones preferidas se ensayan los criterios de valoración neurológicos (por ejemplo, carga de amiloide, carga neurítica, etc.). Tales criterios de valoración pueden ensayarse en sujetos vivos (por ejemplo, en modelos animales de enfermedad de Alzheimer o en sujetos humanos, por ejemplo, que reciben inmunoterapia) usando metodologías de detección no invasivas. Alternativamente, tales criterios de valoración pueden ensayarse en sujetos cadavéricos. El ensayo de tales criterios de valoración en modelos animales y/o en sujetos humanos cadavéricos es útil en la evaluación de la eficacia de diversos agentes (por ejemplo, anticuerpos humanizados) que va a usarse en aplicaciones inmunoterapéuticas similares. En otras realizaciones preferidas, los parámetros de comportamiento o neurológicos pueden evaluarse como indicadores de las actividades o criterios de valoración neuropatológicos anteriores.

3. Producción de regiones variables

Habiendo seleccionado conceptualmente la CDR y componentes de la región estructural de inmunoglobulinas humanizadas, una variedad de procedimientos están disponibles para producir tales inmunoglobulinas. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codificará cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina. Las secuencias de ácidos nucleicos deseadas pueden producirse por síntesis *de novo* de ADN en fase sólida o por mutagénesis por PCR de una variante anteriormente preparada del polinucleótido deseado. La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un procedimiento preferido para preparar variantes de sustitución, delección e inserción de ADN de polipéptido diana. Véase Adelman y col., DNA 2:183 (1983). Brevemente, el ADN de polipéptido diana se altera hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada para un molde de ADN monocatenario. Después de la hibridación se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria entera del molde que incorpora el cebador de oligonucleótidos, y codifica la alteración seleccionada en el ADN de polipéptido diana.

4. Selección de regiones constantes

Los segmentos variables de anticuerpos producidos como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, las regiones variables de la cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos o humanizados) se ligan normalmente a al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (región Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Las secuencias de ADN de la región constante humana pueden aislarse según procedimientos muy conocidos de una variedad de células humanas, pero preferentemente linfocitos B inmortalizados (véanse Kabat y col., anteriormente, y Liu y col., documento W087/02671). Generalmente, el anticuerpo contendrá regiones constantes de tanto la cadena ligera como la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada normalmente 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, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Si se desea que el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo humanizado) presente actividad citotóxica, el dominio constante es normalmente un dominio constante de fijación del complemento y la clase es normalmente IgG1. Se prefiere el isotipo IgG1 humana. Las regiones constantes de la 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 separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab' F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos monocatenarios en los que los dominios variables de la cadena pesada y ligera están ligados por un espaciador.

5. Expresión de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos quiméricos y humanizados se producen normalmente por expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican regiones variables de la cadena ligera y pesada, opcionalmente ligados a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligeras y pesadas pueden clonarse en el mismo vector de expresión o vectores de expresión diferentes. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina están operativamente ligados a secuencias de control en el (los) vector(es) de expresión que garantizan la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina. Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a, promotores (por ejemplo, promotores naturalmente asociados 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 que pueden transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez se ha incorporado el vector en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y purificación de los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada.

Estos vectores de expresión son normalmente replicables en los organismos huésped tanto como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico huésped. Comúnmente, 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 aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Itakura y col., patente de EE.UU. 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, tal como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariontas también pueden prepararse 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 número de una variedad de promotores muy 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 controlarán normalmente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitios de unión a ribosoma y similares para iniciar y completar la transcripción u traducción.

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

Además de los microorganismos también puede usarse cultivo de células de tejido de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de la misma). Véase Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Las células eucariotas son en realidad preferidas debido a que en la materia se han desarrollado varias líneas de células huésped adecuadas que pueden secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas), e incluyen líneas de células CHO, diversas líneas de célula Cos, células HeLa, preferentemente líneas de células de mieloma, o linfocitos B transformados o hibridomas. Preferentemente, las células son no humanas. 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 información para el procesamiento necesario, tales como sitios de unión a ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co y col., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Alternativamente, las secuencias codificantes de anticuerpos pueden incorporarse en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico no humano y posterior expresión en la leche del animal transgénico no humano (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). Transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en enlace operable con un promotor y potenciador de un gen específico para glándula mamaria, tal como caseína o beta-lactoglobulina.

Vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias codificantes de la cadena pesada y ligera y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped por procedimientos muy conocidos, que varían dependiendo del tipo de celular huésped. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se ⁹⁰Ca comúnmente para células procariontas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus puede usarse para otros huéspedes celulares (véase generalmente Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989) (incorporado por referencia en su totalidad para todos los fines). Otros procedimientos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y

microinyección (véase generalmente Sambrook y col., anteriormente). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden microinyectarse en ovocitos fecundados, o pueden incorporarse en el genoma de citoblastos embrionarios, y transferirse los núcleos de tales células a ovocitos enucleados.

- 5 Cuando las cadenas pesadas y ligeras se clonan en vectores de expresión separados, los vectores se co-transfectan para obtener la expresión y el ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden purificarse según procedimientos convencionales de la materia, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase generalmente Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982))).
- 10 Para usos farmacéuticos se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95 % de homogeneidad, y las más preferidas del 98 al 99 % o más de homogeneidad.

6. Fragmentos de anticuerpos

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

7. Prueba de anticuerpos para eficacia terapéutica en modelos animales

- 20 Grupos de ratones PDAPP de 7-9 meses de edad se inyectan cada uno con 0,5 mg en PBS de anticuerpos anti-A β policlonales o anti-A β monoclonales específicos. Todas las preparaciones de anticuerpo se purifican para tener bajos niveles de endotoxina. Los monoclonales pueden prepararse contra un fragmento inyectando el fragmento o forma más larga de A β en un ratón, preparando hibridomas y cribando los hibridomas para un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento deseado de A β sin unirse a otros fragmentos no solapantes de A β .
- 25 Los ratones se inyectan intraperitonealmente según se necesite durante un periodo de 4 meses para mantener una concentración de anticuerpo en circulación medida por título de ELISA superior a 1/1000 definida por ELISA para A β 42 u otro inmunógeno. Los títulos se monitorizan y los ratones se sacrifican al final de 6 meses de inyecciones. La histoquímica, niveles de A β y toxicología se realizan en la autopsia. Se usan diez ratones por grupo.

8. Cribado de anticuerpos para actividad de eliminación

- 30 La invención también proporciona procedimientos de cribado de un anticuerpo para la actividad en eliminar un depósito de amiloide o cualquier otro antígeno, o entidad biológica asociada, para lo que se desea actividad de eliminación. Para cribar para actividad contra un depósito de amiloide, una muestra de tejido de un cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer o un modelo animal que tiene patología de Alzheimer característica se pone en contacto con células fagocíticas que llevan un receptor de Fc, tal como células de la microglía, y el anticuerpo en
- 35 prueba en un 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 algunos procedimientos, los componentes se combinan sobre un portaobjetos de microscopio para facilitar la monitorización microscópica. En algunos procedimientos se realizan múltiples reacciones en paralelo en los pocillos de una placa de microtítulo. En un formato tal, un portaobjetos de microscopio en miniatura separado puede montarse en los pocillos separados, o puede usarse un formato de detección no microscópico, tal como detección por ELISA de A β . Preferentemente se hace una serie de mediciones de la cantidad de depósito de amiloide en la mezcla de reacción *in vitro* a partir de un valor del nivel inicial antes de que avance la reacción, y uno o más valores de prueba durante la reacción. El antígeno puede detectarse por tinción, por ejemplo, con un anticuerpo fluorescentemente marcado para A β u otro componente de placas amiloides. El anticuerpo usado para la tinción puede ser o puede no ser el
- 45 mismo que el anticuerpo que se prueba para la actividad de eliminación. Una reducción con respecto al nivel inicial durante la reacción de los depósitos de amiloide indica que el anticuerpo en prueba tiene actividad de eliminación. Probablemente, tales anticuerpos son útiles en la prevención o el tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas. Anticuerpos particularmente útiles para prevenir o tratar Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas incluyen aquellos que pueden eliminar tanto placas amiloides compactas como difusas, por
- 50 ejemplo, el anticuerpo 12B4 de la presente invención, o versiones quiméricas o humanizadas del mismo.

- Pueden usarse procedimientos análogos para cribar anticuerpos para actividad en la eliminación de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo puede usarse para detectar actividad de eliminación contra prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. Normalmente, la entidad biológica tiene alguna función en la enfermedad humana o animal. La entidad biológica puede proporcionarse como una muestra de tejido o en forma aislada. Si se proporciona
- 55 como una muestra de tejido, la muestra de tejido está preferentemente sin fijar para permitir el fácil acceso a los componentes de la muestra de tejido y para evitar perturbar la conformación de los componentes secundarios a la fijación. Ejemplos de muestras de tejido que pueden probarse 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 lleva matrices patológicas entre células (por ejemplo, pericarditis fibrinosa), tejido que lleva antígenos anormales y tejido cicatricial. Ejemplos de entidades biológicas aisladas que pueden usarse incluyen A β , antígenos víricos o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos de tumor 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 llevan receptores de Fc tales como monocitos o células de la microglía, y un anticuerpo que va a probarse en un medio. El anticuerpo puede dirigirse hacia la entidad biológica en prueba o hacia un antígeno asociado a la entidad. En la última situación, el objeto es probar si la entidad biológica es fagocitada con el antígeno. Normalmente, aunque no necesariamente, el anticuerpo y la entidad biológica (algunas veces con un antígeno asociado) se ponen en contacto entre sí antes de añadir las células fagocíticas. Entonces se monitoriza la concentración de la entidad biológica y/o el antígeno asociado que queda en el medio, si está presente. Una reducción en la cantidad o concentración de antígeno o la entidad biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de eliminación contra el antígeno y/o entidad biológica asociada junto con las células fagocíticas (véase, por ejemplo, el Ejemplo IV).

9. *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 desearse alterar la función efectora de la molécula. Generalmente, la función efectora de un anticuerpo reside en la región constante o Fc de la molécula que puede mediar en la unión a diversas moléculas efectoras, por ejemplo, proteínas del complemento o receptores de Fc. La unión del complemento a 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 a receptores de Fc, por ejemplo, sobre la superficie de células efectoras, puede desencadenar varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen, por ejemplo, ahogamiento y destrucción de patógenos o partículas recubiertas con anticuerpo, eliminación de complejos inmunitarios, lisis de células diana recubiertas con anticuerpo por células asesinas (es decir, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria de anticuerpos y control de la producción de inmunoglobulina.

Por consiguiente, dependiendo de una aplicación terapéutica o de diagnóstico particular, pueden ser deseables las funciones inmunitarias anteriormente mencionadas, o sólo funciones inmunitarias seleccionadas. Alterando la región Fc del anticuerpo se logran varios aspectos de la función efectora de la molécula, que incluyen potenciamiento o supresión de diversas reacciones del sistema inmunitario, con efectos beneficiosos en diagnóstico y terapia.

Pueden producirse anticuerpos de la invención que reaccionan sólo con ciertos tipos de receptores de Fc, por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden modificarse para unirse a sólo ciertos receptores de Fc o, si se desea, carecer completamente de unión a receptor de Fc, 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 más adelante. Normalmente, el sistema de numeración de Kabat se usa para indicar qué residuo(s) de aminoácido(s) de la región Fc (por ejemplo, de un anticuerpo IgG) está(s) alterado(s) (por ejemplo, por sustitución de aminoácidos) con el fin de lograr un cambio deseado en la función efectora. El sistema de numeración también se emplea para comparar anticuerpos a través de especies de forma que una función efectora deseada observada en, por ejemplo, un anticuerpo de ratón pueda luego manipularse sistemáticamente en un anticuerpo humano, humanizado o quimérico de la invención.

Por ejemplo, se ha observado que los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos IgG) pueden agruparse en aquellos que se encuentra que presentan unión fuerte, intermedia o débil para un receptor de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc sobre monocitos humanos (Fc γ RI)). Por comparación de las secuencias de aminoácidos en estos grupos de afinidad diferentes se ha identificado un sitio de unión a monocito en la región de unión a bisagra (Leu234-Ser239). Además, el receptor de Fc γ RI humano se une a IgG1 humana 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 a bisagra muestra que la secuencia 234 a 238, es decir, Leu-Leu-Gly-Gly-Pro (SEC ID N $^{\circ}$: 39) en los ligantes fuertes se convierte en Leu-Glu-Gly-Gly-Pro (SEC ID N $^{\circ}$: 40) en gamma 2b de ratón, es decir, ligantes débiles. Por consiguiente, puede hacerse un cambio correspondiente en una secuencia bisagra de anticuerpo humano si se desea unión reducida al receptor de Fc γ I. Se entiende que pueden hacerse otras alteraciones para lograr los mismos resultados o similares. Por ejemplo, la afinidad de la unión a Fc γ RI puede alterarse reemplazando el residuo especificado con un residuo que tiene un grupo funcional inapropiado sobre su cadena lateral, o introduciendo un grupo funcional cargado (por ejemplo, Glu o Asp) o, por ejemplo, un residuo 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 secuencias entre las diferentes inmunoglobulinas. Se ha mostrado que para IgG3 humana, que se une al receptor Fc γ RI humano, el cambio de Leu 235 a Glu destruye la interacción del mutante por el receptor. Por tanto, el sitio de unión para este receptor puede activarse o desactivarse haciendo la mutación apropiada.

Mutaciones sobre sitios adyacentes o próximos en la región de unión bisagra (por ejemplo, que sustituyen los residuos 234, 236 ó 237 con Ala) indican que las alteraciones en los residuos 234, 235, 236 y 237 al menos afectan la afinidad por el receptor FcγRI. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención también pueden tener una región Fc alterada con afinidad de unión alterada por FcγRI en comparación con el anticuerpo sin modificar. Un anticuerpo tal tiene convenientemente una modificación en el residuo de aminoácido 234, 235, 236 ó 237.

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

Como otro ejemplo, las propiedades líticas de anticuerpos IgG pueden alterarse tras la unión del componente C1 del complemento.

El primer componente del sistema de complemento, C1, comprende tres proteínas conocidas como C1q, C1r y C1s que se unen muy juntas. Se ha mostrado que C1q es responsable de la unión del complejo de tres proteínas a un anticuerpo.

Por consiguiente, la actividad de unión de C1q de un anticuerpo puede alterarse proporcionando un anticuerpo con un dominio CH2 alterado en el que al menos uno de los residuos de aminoácidos 318, 320 y 322 de la cadena pesada se ha cambiado a un residuo que tiene una cadena lateral diferente. La numeración de los residuos en la cadena pesada es la del índice de EU (véase Kabat y col., anteriormente). Otras alteraciones adecuadas para alterar, por ejemplo, reducir o abolir la unión de C1q específica a un anticuerpo incluyen cambiar uno cualquiera de los residuos 318 (Glu), 320 (Lys) y 322 (Lys) a Ala.

Además, haciendo mutaciones en estos residuos se ha mostrado que la unión de C1q es retenida en tanto que el residuo 318 tenga una cadena lateral de unión a hidrógeno y los residuos 320 y 322 tengan ambos una cadena lateral positivamente cargada.

La actividad de unión de C1q puede abolirse reemplazando uno cualquiera de los tres residuos especificados con un residuo que tiene una funcionalidad inapropiada sobre su cadena lateral. Es necesario sustituir los residuos iónicos sólo con Ala para abolir la unión de C1q. También es posible usar otros residuos no iónicos sustituidos con alquilo tales como Gly, Ile, Leu o Val, o residuos no polares aromáticos tales como Phe, Tyr, Trp y Pro en lugar de uno cualquiera de los tres residuos con el fin de abolir la unión de C1q. Además, también es posible usar residuos no iónicos polares tales como Ser, Thr, Cys y Met en lugar de los residuos 320 y 322, pero no 318, con el fin de abolir la actividad de unión de C1q.

También se observa que las cadenas laterales sobre residuos polares iónicos o no iónicos podrán formar puentes de hidrógeno de un modo similar a los enlaces formados por el residuo de Glu. Por tanto, la sustitución del residuo 318 (Glu) por un residuo polar puede modificar, pero no abolir, la actividad de unión de C1q.

También se sabe que la sustitución del residuo 297 (Asn) con Ala produce la eliminación de la actividad lítica, mientras que sólo se reduce ligeramente (aproximadamente tres veces más débil) la afinidad por C1q. Esta alteración destruye el sitio de glucosilación y la presencia de hidrato de carbono que se requiere para la activación del complemento. 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 clase o subclase de anticuerpo diferente de la del dominio CH1. Por ejemplo, el dominio constante (CH1) de un anticuerpo de clase IgG puede unirse a una región bisagra de un anticuerpo de clase IgG4. Alternativamente, la nueva región bisagra puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad de repetición en la que cada unidad en la repetición se deriva de una región bisagra natural. En un ejemplo, la región bisagra natural se altera convirtiendo uno o más residuos de cisteína en un residuo neutro, tal como alanina, o convirtiendo residuos adecuadamente situados en residuos de cisteína. Tales alteraciones se llevan a cabo usando química de proteínas reconocida en la materia y, preferentemente, técnicas de ingeniería genética, como se describen en el presente documento.

En una realización de la invención, el número de residuos de cisteína en la región bisagra del anticuerpo se reduce, por ejemplo, a un residuo de cisteína. Esta modificación tiene la ventaja de facilitar el ensamblaje del anticuerpo, por ejemplo, moléculas de anticuerpo biespecífico y moléculas de anticuerpo en las que la porción de Fc ha sido sustituida por una molécula efectora o indicadora, ya que sólo es necesaria para formar un único enlace disulfuro. Esta modificación también proporciona una diana específica para unir la región bisagra tanto a otra región bisagra como a una molécula efectora o indicadora, tanto directamente como indirectamente, por ejemplo, por medios químicos.

En cambio, el número de residuos de cisteína en la región bisagra del anticuerpo aumenta, por ejemplo, al menos uno más que el número de residuos de cisteína que normalmente se producen. El aumento del número de residuos 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, una radiomarca.

Por consiguiente, la invención proporciona un intercambio de regiones bisagra entre clases de anticuerpo, en particular clases de IgG, y/o un aumento o disminución en el número de residuos de cisteína en la región bisagra con el fin de lograr una función efectora alterada (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.677.425).

5 Una determinación de la función efectora de anticuerpos alterados se hace usando los ensayos descritos en el presente documento u otras técnicas reconocidas en la materia.

Y, lo que es más importante, 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, además de cualquier ensayo reconocido en la materia.

10 La producción de los anticuerpos de la invención se lleva a cabo por cualquier técnica adecuada que incluye las técnicas descritas en el presente documento, además de técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, una secuencia de proteínas apropiada, por ejemplo, que forma parte de o todo un dominio constante relevante, por ejemplo, región Fc, es decir, dominio(s) CH2 y/o CH3, de un anticuerpo, e incluyen residuo(s) apropiadamente alterado(s), puede sintetizarse y luego unirse químicamente en el sitio apropiado en una molécula de anticuerpo.

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

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 preparativos y procedimientos para su producción.

25 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, alternativamente puede usarse cualquier otra línea celular adecuada, tal como una línea de células bacterianas o una línea de células de levadura.

30 B. Ácido nucleico que codifica agentes inmunológicos y terapéuticos

También pueden inducirse respuestas inmunitarias contra depósitos de amiloide por administración de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y usarse sus cadenas componentes para la inmunización pasiva. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunogén está normalmente ligado a elementos reguladores, tales como un promotor y potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana previstas de un paciente. Para la expresión en glóbulos sanguíneos, como se desea para la inducción de una respuesta inmunitaria, los elementos promotores y potenciadores de los genes de inmunoglobulina de la cadena ligera o pesada o del promotor y potenciador temprano intermedio mayor del CMV son adecuados para la expresión directa. Los elementos reguladores ligados y las secuencias codificantes se clonan frecuentemente en un vector. Para la administración de anticuerpos bicatenarios, las dos cadenas pueden clonarse en el mismo vector o en vectores separados.

45 Están disponibles varios sistemas de vectores víricos que incluyen sistemas retrovíricos (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109 (1993)); vectores adenovíricos (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 víricos de la familia de la viruela que incluyen virus de la variolovacuna y los virus de la viruela aviar, vectores víricos del género de los alfa-virus tales como aquellos derivados del virus de 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 virus del papiloma (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)).

50 El ADN que codifica un inmunogén, o un vector que contiene el mismo, puede encapsidarse en liposomas. Lípidos adecuados y análogos relacionados se describen por Eppstein y col., documento US 5.208.036, Felgner y col., documento US 5.264.618, Rose, documento US 5.279.833, y Epanand y col., documento US 5.283.185. Los vectores y el ADN que codifica un inmunogén también pueden adsorberse a o asociarse a vehículos particulados, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de poli(metacrilato de metilo) y polilactidas y poli(lactida-co-glicolidas), véase, por ejemplo, McGee y col., J. Micro Encap. (1996).

55

Los vectores de terapia génica o polipéptidos desnudos (por ejemplo, ADN) pueden administrarse *in vivo* por administración a un paciente individual, normalmente por administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o administración tópica (véase, por ejemplo, Anderson y col., documento US 5.399.346). El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejado con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos se clonan algunas veces en un vector de plásmido. Tales vectores pueden incluir adicionalmente agentes de facilitación tales como bupivacina (Weiner y col., documento US 5.593.972). También puede administrarse ADN usando una pistola de genes. Véase Xiao & Brandsma, anteriormente. El ADN que codifica un inmunogén se precipita sobre la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles son acelerados con una onda de choque o expandiendo gas helio, y penetran en los tejidos a una profundidad de varias capas de células. Por ejemplo, es adecuado The Accel™ Gene Delivery Device fabricado por Agricetus, Inc. Middleton WI. Alternativamente, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel en la corriente sanguínea simplemente goteando el ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (véase Howell y col., documento WO 95/05853).

En otra variación, los vectores que codifican inmunogenes pueden administrarse a células *ex vivo*, tal como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o citoblastos hematopoyéticos de donantes universales, seguido de reimplantación de las células en un paciente, normalmente después de la selección de células que han incorporado el vector.

II. Procedimientos profilácticos y terapéuticos

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

En un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para prevenir o tratar una enfermedad asociada a depósitos de amiloide de A β en el cerebro de un paciente. Tales enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y deterioro cognitivo. Esta última puede producirse con o sin otras características de una enfermedad amiloidogénica. Algunos procedimientos implican administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un componente de un depósito de amiloide al paciente. Tales procedimientos son particularmente útiles para prevenir o tratar enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos. Los procedimientos implican administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a A β .

En otro aspecto más, la invención muestra administrar anticuerpos que se unen a un epítope dentro de los residuos 3-7 de A β en los que el residuo 7 de A β es ácido aspártico. La invención muestra administrar anticuerpos que se unen específicamente a péptido A β sin unirse a proteína precursora del amiloide (APP) de longitud completa. En otro aspecto más, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana.

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

Los agentes terapéuticos de la invención están normalmente sustancialmente puros de contaminante no deseado. Esto significa que un agente tiene normalmente al menos aproximadamente el 50 % en p/p (peso/peso) de pureza, además de estar sustancialmente libre de proteínas y contaminantes interferentes. Algunas veces, los agentes tienen al menos aproximadamente el 80 % en p/p y, más preferentemente al menos el 90 o aproximadamente el 95 % en p/p de pureza. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, pueden obtenerse péptidos homogéneos de al menos el 99 % en p/p.

Los procedimientos pueden usarse en pacientes tanto asintomáticos como aquellos que actualmente muestran síntomas de 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 muestra administrar anticuerpos preparados a partir de un humano inmunizado con péptido A β , humano que puede ser el paciente que va a tratarse con el anticuerpo.

En otro aspecto, la invención muestra administrar un anticuerpo con un vehículo farmacéutico como composición farmacéutica. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse a un paciente administrando un polinucleótido que codifica al menos una cadena de 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 monitoriza para el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

Por tanto, la invención satisface una necesidad que viene de largo para pautas terapéuticas para prevenir o mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado a enfermedad de Alzheimer.

A. Pacientes aceptados para el tratamiento

5 Los pacientes aceptados para el tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad, pero que no muestran síntomas, además de pacientes que actualmente muestran síntomas. En el caso de enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive el tiempo suficiente. Por tanto, los presentes procedimientos pueden administrarse profilácticamente a la población general sin la necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente objeto. Los presentes procedimientos son especialmente útiles para
 10 individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han sufrido 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 APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y posiciones 670 y 671 denominadas las mutaciones de Hardy y Swedish, respectivamente (véase Hardy, anteriormente). Otros marcadores de riesgo son
 15 mutaciones en los genes presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que actualmente padecen enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por demencia característica, además de la presencia de los factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varias pruebas de diagnóstico para identificar individuos que tienen EA. Éstas incluyen medición de niveles de CSF tau y Aβ42. Niveles elevados de tau y disminuidos de Aβ42 significan la presencia de EA. Los
 20 individuos que padecen enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse por criterios de ADRDA como se trata en la sección de ejemplos.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, es necesario empezar el tratamiento hasta que un paciente llega a 40, 50, 60 ó 70. El tratamiento normalmente implica múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse
 25 ensayando niveles de anticuerpo con el tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosificación de refuerzo. En el caso de posibles pacientes con síndrome de Down, el tratamiento puede empezar prenatalmente administrando agente terapéutico a la madre o poco después del parto.

B. Pautas de tratamiento y dosificaciones

30 En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a o, de otro modo, en riesgo de enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, que incluye síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o
 35 medicamentos se administran a un paciente del que se sospecha 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 de comportamiento), que incluyen sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

En algunos procedimientos, la administración del agente reduce o elimina el deterioro miocognitivo en pacientes que todavía no han desarrollado patología de Alzheimer característica. Una cantidad adecuada para realizar tratamiento
 40 terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En pautas tanto profilácticas como terapéuticas, los agentes se administran normalmente en varias dosificaciones hasta que se ha alcanzado una respuesta inmunitaria suficiente. El término "respuesta inmunitaria" o "respuesta inmunológica" incluye el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) y/o celular (mediada por linfocitos T específicos para antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra un antígeno en un sujeto receptor. Una
 45 respuesta tal puede ser una respuesta activa, es decir, inducida por la administración de inmunógeno, o una respuesta pasiva, es decir, inducida por la administración de inmunoglobulina o anticuerpo o linfocitos T sensibilizados. Normalmente, la respuesta inmunitaria se monitoriza y se administran dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria empieza a disminuir.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones
 50 anteriormente descritas, varían dependiendo de muchos factores diferentes que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento necesitan valorarse para optimizar la seguridad y eficacia.

55 Para inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosificación oscila de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente 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 o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. Dosis intermedias en los

intervalos anteriores también pretenden estar dentro del alcance de la invención. A los sujetos pueden administrársele tales dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o según 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 seis meses. Pautas de tratamiento a modo de ejemplo adicionales implican administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. 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, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados.

El anticuerpo se administra normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles en sangre de anticuerpo para A β en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 μ g/ml y en algunos procedimientos 25-300 μ g/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguida de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos.

La dosificación y la frecuencia de la administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o una mezcla de los mismos se administran a un paciente que todavía no está en el estado de enfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Se define que una cantidad tal es una "dosis eficaz profiláctica". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y la inmunidad general, pero generalmente oscilan de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 200 mg de anticuerpo por dosis, siendo las dosificaciones de 5 a 25 mg las más comúnmente usadas) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de síntomas de enfermedad. Después, al paciente puede administrársele una pauta profiláctica.

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

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica 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 lo 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 prefieren inyección intramuscular o infusión intravenosa para la administración del anticuerpo. En algunos procedimientos, anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos procedimientos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad[®].

Los agentes de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de enfermedad amiloidogénica. En el caso de Alzheimer y síndrome de Down, en los que se producen depósitos de amiloide en el cerebro, los agentes de la invención también pueden administrarse conjuntamente con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera hematoencefálica. Los agentes de la invención también pueden administrarse en combinación con otros agentes que potencian el acceso del agente terapéutico a una célula diana o tejido, por ejemplo, liposomas y similares. La coadministración de tales agentes puede disminuir la dosificación de un agente terapéutico (por ejemplo, anticuerpo terapéutico o cadena de anticuerpo) necesaria para lograr un efecto deseado.

C. Composiciones farmacéuticas

Los agentes de la invención se administran frecuentemente como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1980)). La forma preferida depende del modo previsto 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 comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente está seleccionado de forma que no afecte la actividad biológica de la

combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

- 5 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como Sepharose(TM) funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar de agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).
- 10 Para administración parenteral, los agentes de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una disolución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como aceites en agua, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias de tamponamiento del pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de
- 15 composiciones farmacéuticas son aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante, que pueden formularse de tal forma que se permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición a modo de ejemplo comprende
- 20 anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

- Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, tanto como disoluciones como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o
- 25 micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para el efecto adyuvante potenciado, como se trata 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 liberación prolongada o preparación de implante, que puede formularse de tal forma que se permita una liberación sostenida o pulsada del principio activo.
- 30 Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Para supositorios, aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferentemente del 1 %-2 %. Formulaciones orales incluyen excipientes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio,
- 35 sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 %-95 % de principio activo, preferentemente 25 %-70 %.

- La administración tópica puede producir administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse por co-administración del agente con toxina del cólera o derivados desintoxicados o subunidades de los
- 40 mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn y col., Nature 391, 851 (1998)). La co-administración puede lograrse usando los componentes como una mezcla o como moléculas ligadas obtenidas por reticulación o expresión química como una proteína de fusión.

Alternativamente, la administración transdérmica puede lograrse usando una ruta de la piel o usando transferosomas (Paul y col., Eur. J. Immunol. 25:3521 (1995); Cevc y col., Biochem. Biophys. Acta 1368:201-15 (1998)).

45 III. Monitorización de la evolución del tratamiento

- La divulgación proporciona procedimientos de monitorización del tratamiento en un paciente que padece o susceptible a Alzheimer, es decir, para monitorizar una evolución del tratamiento que se administra a un paciente. Los procedimientos pueden usarse para monitorizar tanto tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como
- 50 tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. En particular, los procedimientos son útiles para monitorizar inmunización pasiva (por ejemplo, medir el nivel de anticuerpo administrado).

- Algunos procedimientos implican determinar un valor del nivel inicial, por ejemplo, de un nivel o perfil de anticuerpo en un paciente, antes de administrar una dosificación de agente, y comparar este con un valor para el perfil o nivel después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, superior al margen típico del error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales
- 55 mediciones) en el valor del nivel o perfil indica un desenlace del tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha alcanzado una respuesta deseada). Si el valor para la respuesta inmunitaria no cambia significativamente, o disminuye, se indica un desenlace del tratamiento negativo.

En otros procedimientos se determina un valor de control (es decir, una media y desviación estándar) del nivel o

perfil para una población de control. Normalmente, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos del nivel o perfil en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan luego con el valor de control. Un aumento significativo con respecto al valor de control (por ejemplo, superior a una desviación estándar de la media) indica un desenlace del tratamiento positivo o suficiente.

5 Una falta de aumento significativo o una disminución indica un desenlace del tratamiento negativo o insuficiente. La administración del agente continúa generalmente mientras que el nivel vaya aumentando con respecto al valor de control. Como antes, el logro de una meseta con respecto a valores de control es un indicador de que la administración de tratamiento puede interrumpirse o reducirse en dosificación y/o frecuencia.

10 En otros procedimientos, un valor de control del nivel o perfil (por ejemplo, una media y desviación estándar) se determina a partir de una población de control de individuos que han recibido tratamiento con un agente terapéutico y cuyos niveles o perfiles tienen una meseta en respuesta a tratamiento. Los valores medidos de 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 estándar) del valor de control, el tratamiento puede interrumpirse. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, la administración continuada del agente se garantiza. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces puede indicarse un cambio en el tratamiento.

15 En otros procedimientos, un paciente que no está actualmente recibiendo tratamiento, pero que ha experimentado una evolución previa del tratamiento, se monitoriza para los niveles de anticuerpos 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 alcanzado en el paciente después de una evolución previa del tratamiento. Una disminución significativa con respecto a la medición previa (es decir, superior a un margen de error típico en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento puede reanudarse. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de experimentar una evolución del tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes profilácticamente tratados que siguen estando libres de síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes terapéuticamente tratados que muestran mejora de las características de enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa con respecto al nivel de control (es decir, superior a una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en un paciente.

20 La muestra de tejido para análisis es normalmente sangre, plasma, suero, líquido mucoso o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza, por ejemplo, para niveles o perfiles de anticuerpos para el péptido A β , por ejemplo, niveles o perfiles de anticuerpos humanizados. Los procedimientos de ELISA de detección de anticuerpos específicos para A β 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 de tejido de un paciente que se prueba se pone en contacto con depósitos de amiloide (por ejemplo, de un ratón PDAPP) y células fagocíticas que llevan receptores de Fc. Entonces se monitoriza la posterior eliminación del depósito de amiloide. La existencia y el grado de la respuesta de eliminación proporcionan una indicación de la existencia y el nivel de anticuerpos eficaces para eliminar A β en la muestra de tejido del paciente en prueba.

30 El perfil de anticuerpos tras la inmunización pasiva normalmente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpos, seguido de un decaimiento exponencial. Sin otra dosificación, el decaimiento se aproxima a niveles de pretratamiento en el plazo de un período de días a meses dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado.

35 En algunos procedimientos se hace una medición del nivel inicial del anticuerpo para A β en el paciente antes de la administración, se hace una segunda medición poco después de determinar el nivel de pico del anticuerpo, y se hacen una o más mediciones adicionales a intervalos para monitorizar el decaimiento de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo ha disminuido hasta el nivel inicial o un porcentaje predeterminado del pico menos el nivel de inicial (por ejemplo, 50 %, 25 % o 10 %), se administra la administración de otra dosificación de anticuerpo. En algunos procedimientos se comparan el pico o niveles medidos posteriores menos la referencia con niveles de referencia previamente determinados para constituir una pauta de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficiosa en otros pacientes. Si el nivel medido de anticuerpo es significativamente inferior a un nivel de referencia (por ejemplo, inferior a la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento), se indica la administración de una dosificación adicional de anticuerpo.

40 Procedimientos adicionales incluyen monitorizar durante la evolución del tratamiento cualquier síntoma fisiológico reconocido en la materia (por ejemplo, síntoma físico o mental) rutinariamente confiado por investigadores o médicos para diagnosticar o monitorizar enfermedades amiloidogénicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Por ejemplo, puede monitorizarse deterioro cognitivo. Este último es un síntoma de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down, pero también puede producirse sin otras características de cualquiera de estas enfermedades. Por ejemplo, el deterioro cognitivo puede monitorizarse determinando la puntuación de un paciente en el minexamen del estado mental según convención durante toda la evolución de tratamiento.

60

C. Obtención de imágenes in vivo

5 La divulgación proporciona procedimientos de obtención de imágenes *in vivo* de depósitos de amiloide en un paciente. Tales procedimientos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, o susceptibilidad a la misma. Por ejemplo, los procedimientos pueden usarse en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene depósitos de amiloide anormales, entonces es probable que el paciente padezca enfermedad de Alzheimer. Los procedimientos también pueden usarse en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloide indica susceptibilidad a futura enfermedad sintomática. Los procedimientos también son útiles para monitorizar la progresión y/o respuesta de la enfermedad a un tratamiento en pacientes que han sido previamente diagnosticados con enfermedad de Alzheimer.

10 Los procedimientos trabajan administrando una inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno de la misma (anticuerpo) que se une a Aβ al paciente y luego detectando este agente después de que se haya unido. Los anticuerpos se unen a depósitos de Aβ en un paciente sin unirse a polipéptido APP de longitud completa y se unen a un epitope de Aβ dentro de los aminoácidos 3-7.

15 Tales anticuerpos normalmente se unen e inducen una respuesta de eliminación a Aβ. Sin embargo, la respuesta de eliminación puede evitarse usando fragmentos de anticuerpos que carecen de una región constante de longitud completa, tal como Fab. En algunos procedimientos, el mismo anticuerpo puede servir tanto de tratamiento como de reactivo de diagnóstico.

20 Los reactivos de diagnóstico pueden administrarse mediante inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro por inyección intracraneal o perforando un orificio a través del cráneo. La dosificación de reactivo debe estar dentro de los mismos intervalos que para los procedimientos de tratamiento. Normalmente, el reactivo está marcado, aunque en algunos procedimientos el reactivo primario con afinidad por Aβ está sin marcar y se usa un agente de marcado secundario para unirse al reactivo primario. La elección de marca depende de los medios de detección. Por ejemplo, una marca fluorescente es adecuada para detección óptica. El uso de marcas paramagnéticas es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. También pueden detectarse marcas radiactivas usando PET o SPECT.

25 El diagnóstico se realiza comparando el número, tamaño y/o intensidad de loci marcados con valores del nivel inicial correspondientes. Los valores del nivel inicial pueden representar los niveles medios en una población de individuos sin enfermar. Los valores del nivel inicial también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores del nivel inicial pueden determinarse en un paciente antes de empezar el tratamiento, y compararse los valores medidos después de esto con los valores del nivel inicial. Una disminución en los valores con respecto al nivel inicial indica una respuesta positiva al tratamiento.

30 La presente invención se describirá más completamente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

35 Los siguientes identificadores de secuencias se usan durante toda la sección de ejemplos para referirse a secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena de inmunoglobulina.

Anticuerpo	Secuencia de nucleótidos de VL	Secuencia de aminoácidos de VL	Secuencia de nucleótidos de VH	Secuencia de aminoácidos de VH
12B4	SEC ID N°: 1	SEC ID N°: 2	SEC ID N°: 3	SEC ID N°: 4
12B4v1 humanizado	SEC ID N°: 5	SEC ID N°: 6	SEC ID N°: 7	SEC ID N°: 8
12B4v2 humanizado	<u>SEC ID N°: 5</u>	<u>SEC ID N°: 6</u>		SEC ID N°: 10
12B4v3 humanizado	<u>SEC ID N°: 5</u>	<u>SEC ID N°: 6</u>		SEC ID N°: 12
A19 de la línea germinal	SEC ID N°: 29	SEC ID N°: 30		
ID de Kabat 005036	SEC ID N°: 31	SEC ID N°: 32		
ID de Kabat 000333			SEC ID N°: 33	SEC ID N°: 34
VH4-61 de la línea germinal			SEC ID N°: 35	SEC ID N°: 36
VH4-39 de la línea germinal			SEC ID N°: 37	SEC ID N°: 38

Como se usa en el presente documento, una secuencia de anticuerpo o inmunoglobulina que comprende una secuencia de VL y/o VH como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 1-8, 10, 12 ó 29-38 puede comprender tanto la secuencia completa como puede comprender la secuencia madura (es decir, péptido maduro sin el péptido

señal o conductor).

Ejemplo I. Clonación y secuenciación de las regiones variables de 12B4 de ratón

5 *Clonación y análisis de secuencias de VH de 12B4.* Las regiones VH y VL de 12B4 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 (SEC ID N°: 3) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 4) deducidas derivadas de dos clones de ADNc independientes que codifican el supuesto dominio VH de 12B4 se exponen en la Tabla 2 y la Tabla 3, respectivamente.

Tabla 2: Secuencia de ADN de VH de 12B4 de ratón

ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCTGTCCCA
GGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGA
 CTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCAGTCTGAGCACTAATGGTATGGGTGTGAGCTGGATTTCGT
 CAGCCCTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGAGGACAAGCG
 CTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCTAACAATCAGG
 TATTCCTCAAGATCACCAATGTGGACTGCTGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGA
 AGGAGGATCATCTATGATGTTGAGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT
 CACAGTCTCCTCAG (SEC ID N°: 3)

* Péptido conductor subrayado

Tabla 3: Secuencia de aminoácidos de VH de 12B4 de ratón

mdrltssflllivpayvlsqVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLStngmgvsWIR
 QPSGKGLEWLAhiywdedkrynpslksRLTISKDTSNNQVFLKITNVDTADTATYYCAR
 rriiydvedyfdyWGQGTTLTVSS (SEC ID N°: 4)

* Péptido conductor y CDR en minúsculas.

10 *Clonación y análisis de secuencias de VL de 12B4.* La región VL variable de la cadena ligera de 12B4 se clonó de un modo análogo a la región VH. La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) deducidas derivadas de dos clones de ADNc independientes que codifican el supuesto dominio VL de 12B4 se exponen en la Tabla 4 y la Tabla 5, respectivamente.

Tabla 4: Secuencia de ADN de VL de 12B4 de ratón

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGA
TGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA
 TCTCTTGAGATCTAGTCAGAACATTGTTTCATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG
 TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATT
 TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGA
 TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTT

CCGCTCACGTTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC (SEC ID N°: 1)

* Péptido conductor subrayado

Tabla 5: Secuencia de aminoácidos de VL de 12B4 de ratón

mklpvrllvmlfwipasssDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCrssqnvhsngntyleW
 YLQKPGQSPKLLIYkvsnrfsGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCfqgshv
 p1tFGAGTKLELK (SEC ID N°: 2)

* Péptido conductor y CDR en minúsculas.

5 Las secuencias de VL y VH de 12B4 cumplen los criterios para regiones V funcionales en tanto que contienen un ORF contiguo desde la metionina iniciadora hasta la región C, y comparten residuos conservados característicos de genes de la región V de inmunoglobulina. Desde el extremo N hasta el extremo C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según la numeración convención de Kabat y col., anteriormente.

Ejemplo II: Expresión del anticuerpo quimérico 12B4

10 *Expresión del anticuerpo quimérico 12B4:* Las regiones variables de la cadena pesada y ligera se volvieron a modificar para codificar secuencias donantes de corte y empalme en la dirección 3' de los cruces VDJ o VJ respectivos, y se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCMV-hγ1 para la cadena pesada y pCMV-hk1 para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes γ1 y Cκ humanas como fragmentos exónicos en la dirección 3' del casete de la región variable insertado. Tras la verificación de secuencias, los vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera se cotransfectaron en células COS. Diversos clones de la cadena pesada se cotransfectaron independientemente con diferentes clones de la cadena ligera quimérica para confirmar la reproducibilidad del resultado. El medio acondicionado se recogió 48 h después de la transfección y se ensayó por análisis de transferencia Western para la producción de anticuerpo o ELISA para la unión a Aβ. Los transfectantes múltiples expresaron todas combinaciones de cadena pesada + cadena ligera que son reconocidos por un anticuerpo anti-IgG humana (H+L) de cabra en una transferencia Western.

20 La unión directa de anticuerpos quiméricos 12B4 para Aβ se probó por ensayo de ELISA. La Figura 5 demuestra que se encontró que 12B4 quimérico se unía a Aβ con alta avidéz, similar a la demostrada por 3D6 quimérico y humanizado (Figura 5) (la clonación, caracterización y humanización de 3D6 se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 10/010.942, cuyo contenido entero se incorpora en el presente documento por esta referencia). Además, un ensayo de inhibición competitiva basado en ELISA reveló que el anticuerpo 12B4 quimérico y 12B4 murino compitieron igualmente con 3D6 murino y quimérico biotinilado, además de 10D5 (un anticuerpo monoclonal murino del isotipo IgGγ1 que reconoce el mismo epítoto que 12B4) en la unión a Aβ. La Figura 6 demuestra que 12B4 quimérico (línea discontinua, triángulos blancos) compite con igual potencia con su homólogo murino no biotinilado (línea continua, triángulos rellenos) por la unión de 12B4 murino biotinilado al péptido Aβ 1-42.

Ejemplo III: Eficacia del mAb 12B4 sobre diversos criterios de valoración neuropatológicos en ratones PDAPP

30 Este ejemplo describe la eficacia del mAb 12B4 murino sobre diversos criterios de valoración neuropatológicos. Se describe la comparación de dos mAb, 12B4 y 3D6. Ambos mAb son del isotipo IgG2a y ambos se unen a epítoto dentro del extremo N del péptido Aβ.

Inmunizaciones

35 Ratones PDAPP se inmunizaron pasivamente con tanto el mAb 12B4 (que reconoce 3-7 de Aβ) como el mAb 3D6 (que reconoce 1-5 de Aβ), ambos del isotipo IgGγ2a. 12B4 se probó a 10 mg/kg. 3D6 se administró a tres dosis diferentes, 10 mg/kg, 1 mg/kg y 10 mg/kg, una vez al mes (1 x 4). Un anticuerpo IgGγ2a sin relacionar (TY 11/15) e inyecciones de PBS sirvieron de controles. La inmunización activa con el péptido Aβ sirvió de comparación. En cada grupo se analizaron entre 20 y 35 animales.

Los criterios de valoración neuropatológicos ensayados incluyen carga de amiloide y carga neurítica.

40 Carga de amiloide

El grado de la corteza frontal ocupada por depósitos de amiloide se determinó por inmunotinción con 3D6 seguido de análisis cuantitativo de imágenes. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 6. Todas las inmunoterapias (por ejemplo, inmunización con 12B4, 3D6 (todas las dosis probadas) y péptido Aβ) condujeron a una reducción significativa de la carga de amiloide.

45

Carga neurítica

Previamente se había observado que 10D5 no podía reducir significativamente la carga neurítica, sugiriendo que el anticuerpos del isotipo IgG γ 2a, pero no otros isotipos, podían reducir la carga neurítica en modelos animales de enfermedad de Alzheimer (datos no mostrados). Por tanto, la carga neurítica tras la inmunización pasiva con 12B4 frente a 3D6 (ambos del isotipo IgG γ 2a) se determinó en ratones PDAPP por inmunotinción de secciones de cerebro con el anticuerpo anti-APP 8E5, seguido de análisis cuantitativo de imágenes. La distrofia neurítica se indica por la aparición de neuritas distróficas (por ejemplo, neuritas con un aspecto globular) localizadas en la proximidad inmediata de placas amiloides. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 7. Estos datos indican que el tratamiento con 12B4 redujo muy significativamente la carga neurítica. A diferencia, 3D6 no redujo significativamente la carga neurítica.

Tabla 6: Carga de amiloide de la corteza frontal

	PBS	TY 11/15	12B4	3D6, 10 mg/kg	3D6, 1 mg/kg	3D6, 10 mg/kg/4 semanas	Activa
N	31	30	33	29	31	32	24
Mediana (% de AB)	15,182297	13,303288	2,317222	0,865671	2,286513	1,470956	2,162772
Intervalo	0,160-31,961	0-61,706	0-14,642	0-7,064	0,077-63,362	0-10,688	0-30,715
Valor p (*M-W)		,9425 ns	*** <,0001	***,0001	*** <,0001	*** <,0001	***,0004
% de cambio	N/A	12 %	85 %	94 %	85 %	90 %	86 %

Tabla 7: Carga neurítica de la corteza frontal

	PBS	TY 11/15	12B4	3D6, 10 mg/kg	3D6, 1 mg/kg	3D6, 10 mg/kg/4 semanas	Activa
N	31	30	33	29	31	32	24
Mediana (% de NB)	0,3946	0,3958	0,0816	0,4681	0,3649	0,4228	0,2344
Intervalo	0-1,3828	0-2,6800	0-0,8127	0-1,3098	0-1,5760	0-1,8215	0-1,1942
Valor p (*M-W)		,8967 ns	***,0002	,9587 ns	,6986 ns	>,9999	***,0381
% de cambio		0 %	79 %	0 %	7 %	0 %	41 %

Los resultados anteriores indican que el tratamiento con un anticuerpo para A β del isotipo IgG γ 2a puede ser necesario, pero no suficiente, para reducir la carga neurítica. La unión de A β por un epítipo distinto (es decir, 3-7 de A β) también puede ser esencial para reducir esta patología en ratones PDAPP.

La caracterización de diversos criterios de valoración neuropatológicos en el modelo de ratón PDAPP de enfermedad de Alzheimer proporciona valiosa información que va a ser usada por el experto en el diseño de protocolos de inmunización terapéutica humana apropiada. Por ejemplo, la reducción de la carga neurítica puede llevarse a cabo en sujetos humanos usando una versión humanizada de 12B4 del subtipo IgG1 (es decir, el equivalente humano del subtipo IgG γ 2A en ratones) que se une a un epítipo dentro de los residuos 3-7 de A β .

Ejemplo IV: Ensayo de cribado *ex vivo* para la actividad de anticuerpos contra depósitos de amiloide

Para examinar el efecto de anticuerpos sobre la eliminación de placas se usó un ensayo *ex vivo* en el que células de la microglía primarias se cultivaron con secciones de Cryostat sin fijar de tanto cerebros de ratón PDAPP como de EA humana. Las células de la microglía se obtuvieron de las cortezas cerebrales de ratones DBA/2N neonatos (1-3 días). Las cortezas se disociaron mecánicamente en HBSS (solución salina equilibrada de Hank, Sigma) con 50 μ g/ml de ADNsa I (Sigma). Las células disociadas se filtraron con un filtro celular de 100 μ m (Falcon) y se

centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de crecimiento (DMEM de alta glucosa, 10 % de SBF, 25 ng/ml de GM-CSF murino recombinante (rmGM-CSF)) y las células se sembraron a una densidad de 2 cerebros por matraz de cultivo de plástico T-75. Después de 7-9 días, los matraces se rotaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 h a 37 °C. La suspensión de células se centrifugó a 1000 rpm y se resuspendió en el medio de ensayo.

Secciones de Cryostat de 10 µm de cerebros de ratón PDAPP o de EA humana (intervalo después de la muerte < 3 h) se montaron descongeladas sobre cubreobjetos de vidrio redondos recubiertos con poli-lisina y se dispusieron en pocillos de placas de cultivo de tejido de 24 pocillos. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con medio de ensayo que consistía en H-SFM (medio libre de suero de hibridoma, Gibco BRL) con 1 % de SBF, glutamina, penicilina/estreptomicina y 5 ng/ml de rmGM-CSF (R&D). Los anticuerpos de control o anti-Aβ (12B4) se añadieron a 2x concentración (5 µg/ml final) durante 1 hora. Entonces, las células de la microglía se sembraron a una densidad de $0,8 \times 10^6$ células/ml de medio de ensayo. Los cultivos se mantuvieron en una estufa de incubación humidificada (37 °C, 5 % de CO₂) durante 24 h o más. Al final de la incubación, los cultivos se fijaron con 4 % de paraformaldehído y se permeabilizaron con 0,1 % de Triton-X100. Las secciones se tiñeron con 3D6 biotinilado, seguido de un conjugado de estreptavidina / Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Las células de la microglía exógenas se visualizaron por una tinción nuclear (DAPI). Los cultivos se observaron con un microscopio fluorescente invertido (Nikon, TE300) y se tomaron fotomicrografías con una cámara digital SPOT usando el software SPOT (Diagnostic instruments).

Cuando el ensayo se realizó con secciones de cerebro de PDAPP en presencia de un anticuerpo de control que no tenía eficacia *in vivo*, las placas de β-amiloide permanecieron intactas y no se observó fagocitosis. A diferencia, cuando se cultivaron secciones adyacentes en presencia de 3D6 o 12B4, los depósitos de amiloide desaparecieron en gran medida y las células de la microglía mostraron numerosas vesículas fagocíticas que contenían Aβ (Figura 7). Se obtuvieron resultados similares con secciones de cerebro de EA; 3D6 (una versión humanizada) y 12B4 quimérico indujeron fagocitosis de placas de EA, mientras que IgG1 de control fue ineficaz (Figura 8A-B).

Los datos presentados en los Ejemplos II y III confirman la función de las regiones variables de 12B4 clonadas.

Ejemplo V. Humanización de 12B4

A. Anticuerpo humanizado 12B4, versión 1

Homología/modelado molecular. Con el fin de identificar residuos estructurales clave de la región estructural en el anticuerpo 12B4 murino se generó un modelo tridimensional basado en los anticuerpos murinos más próximos para las cadenas pesadas y ligeras. Para este fin, un anticuerpo designado 2PCP se eligió como molde para modelar la cadena ligera de 12B4 (ID de PDB: 2PCP, Lim y col. (1998) J. Biol. Chem. 273:28576) y un anticuerpo designado 1ETZ se eligió como molde para modelar la cadena pesada. (ID de PDB: 1ETZ, Guddat y col. (2000) J. Mol. Biol. 302:853). El alineamiento de secuencias de aminoácidos de 12B4 con la cadena ligera y cadena pesada de estos anticuerpos reveló que los anticuerpos 2PCP y 1ETZ compartían homología de secuencias significativa con 12B4. Además, los bucles de CDR de los anticuerpos seleccionados se encuentran en las mismas clases estructurales de Chothia canónicas que los bucles de CDR de 12B4. Por tanto, 2PCP y 1ETZ se seleccionaron inicialmente como anticuerpos de estructura resuelta para el modelado de homología de 12B4.

Se construyó un modelo de homología de un primer pase de región variable de 12B4 basado en los anticuerpos observados anteriormente usando el paquete de software Look & SegMod Modules GeneMine (v3.5). Este software se compró bajo una licencia perpetua de Molecular Applications Group (Palo Alto, CA). Este paquete de software, autorizado por Drs. Michael Levitt y Chris Lee, facilita el proceso de modelado molecular automatizando las etapas que participan en el modelado estructural de una secuencia primaria sobre un molde de estructura conocida basado en homología de secuencias. Trabajando en una estación de trabajo Silicon Graphics IRIS bajo un entorno UNIX, la estructura modelada es refinada automáticamente por una serie de etapas de minimización de energía para aliviar contactos atómicos no favorables y optimizar interacciones electrostáticas y de van der Waals. Se construyó otro modelo refinado usando la capacidad de modelado de Quanta®.

Selección de secuencias de anticuerpos aceptores humanos. Se identificaron secuencias de anticuerpos aceptores humanos adecuados por comparaciones informáticas de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se realizó por separado para las cadenas pesadas y ligeras de 12B4. En particular, los dominios variables de anticuerpos humanos cuyas secuencias de la región estructural presentaron un alto grado de identidad de secuencias con las regiones estructurales VL y VH murinas se identificaron por consulta de la base de datos de Kabat usando BLAST de NCBI (públicamente accesible por el servidor de internet del Instituto nacional de la salud NCBI) con las secuencias de la región estructural murina respectivas.

Se eligieron dos secuencias candidatas como secuenciasceptoras basándose en los siguientes criterios: (1) homología con la secuencia del sujeto; (2) compartir estructuras de CDR canónicas con la secuencia donante; y (3) no contener ningún residuo de aminoácido raro en las regiones estructurales. La secuencia aceptora seleccionada para VL es el número de ID de Kabat (KABID) 005036 (nº de acceso de Genbank X67904), y para VH es KABID

000333 (nº de acceso de Genbank X54437). Las primeras versiones del anticuerpo humanizado 12B4 °Can estas secuencias de anticuerpos aceptores seleccionadas.

Sustitución de residuos de aminoácidos. Como se ha observado anteriormente, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden región variables estructurales sustancialmente de una inmunoglobulina humana (inmunoglobulina aceptora) y regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente de una inmunoglobulina de ratón (inmunoglobulina donante) llamada 12B4. Habiendo identificado las regiones determinantes de la complementariedad de 12B4 e inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa fue determinar qué residuos, si los hay, de estos componentes se sustituyen para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante.

10 Región V de la cadena ligera reestructurada:

El alineamiento de aminoácidos de la región V de la cadena ligera reestructurada se muestra en la Figura 1. La elección de la región estructural aceptora (Kabid 005036) es del mismo subgrupo humano que la que se corresponde con la región V murina, no tiene residuos inusuales de la región estructural y las CDR pertenecen a los mismos grupos de estructura canónica de Chothia. Se establece una única retromutación (I2V), ya que este residuo se encuentra en la clasificación canónica. La versión 1 de VL reestructurada es la línea germinal completa.

Región V de la cadena pesada reestructurada:

El alineamiento de aminoácidos de la región V de la cadena pesada reestructurada se muestra en la Figura 2. La elección de la región estructural aceptora (Kabid 000333) es del mismo subgrupo humano que la que se corresponde con la región V murina, no tiene residuos inusuales de la región estructural y las CDR pertenecen a los mismos grupos canónicos de Chothia. El modelado estructural de la cadena de VH murina, conjuntamente con el alineamiento de aminoácidos de Kabid 000333 para la secuencia murina, establece 9 retromutaciones en la versión 1 (v1) de la cadena pesada reestructurada: L2V, V24F, G27F, I29L, I48L, G49A, V67L, V71K y F78V (numeración de Kabat). Las retromutaciones están marcadas por asteriscos en el alineamiento de aminoácidos mostrado en la Figura 2.

De las 9 retromutaciones, 4 están establecidas por el modelo debido a que los residuos son residuos canónicos (V24F, G27F, I29L y V71K, indicados por recuadros rellenos sólidos), es decir, residuos de la región estructural que pueden contribuir a la unión de antígeno en virtud de la proximidad a residuos de CDR. No hay retromutaciones necesarias en la siguiente clase más importante de residuos, los residuos de interfase implicados en las interacciones de acondicionamiento de VH-VL (indicados por recuadros abiertos). Los 5 residuos restantes elegidos como diana para la retromutación (L2V, I48L, G49A, V67L, F78V, numeración de Kabat) se encuentran todos en la clase de Vernier (contribución indirecta a la conformación de CDR, recuadros punteados densos en la Figura 2).

La versión 2 se diseñó para retener el menor número de residuos murinos de no CDR. La retromutación L2V introduce un cambio en la línea no germinal (si se usa VH4-61 como referencia de la línea germinal) y esta retromutación se elimina en la versión 2 de la cadena pesada para restaurarla a la línea germinal. Las 4 retromutaciones de clase de vernier restantes también son restauradas en la versión 2 de la cadena pesada (I48L, G49A, V67L, F78V). Por tanto, la versión 2 contiene un total de 5 residuos murinos de no CDR (1 en VL y 4 en VH). La versión 3 se diseñó para restaurar 2 de los 5 residuos de vernier (I48L y F78V), cuyo modelo indica que pueden ser los residuos de vernier más importantes. Por tanto, la versión 3 contiene un total de 7 residuo murinos de no CDR.

Un resumen de los cambios incorporados en las versiones 1, 2 y 3 de 12B4 humanizado se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de cambios en 12B4.v1 humanizado

Cambios	VL (111 residuos)	VH (123 residuos)
Hu->Mu: Región estructural	1/111	9/123
CDR1	8/16	7/7
CDR2	3/7	8/16
CDR3	6/8	10/13
Hu->Mu total	18/111 (16 %)	34/123 (28 %, v2=23 %)
Mu->Hu: Región estructural	10/111	16/123

ES 2 389 541 T3

(continuación)

Cambios	VL (111 residuos)	VH (123 residuos)
Notas de retromutación	1. I2V: una posición canónica.	2. Canónica: V24F, G27F, 129Ly V71K
		3. Acondicionamiento: ninguno. 4. Vernier: L2V*, I48L#, G49A*, V67L*, F78V#
Notas del aceptor	5. KABID 005036/nº de acceso de Genbank x67904	8. KABID 000333/ nº de acceso de Genbank x54437
	6. CDR del mismo grupo estructural canónico que el ratón donante;	9. CDR del mismo grupo estructural canónico que el ratón donante;
	7. autoanticuerpo anti-cardiolipina/ADNm de paciente con SLE;	10. mAb de factor reumatoide de paciente con AR
* eliminar en v2 y v3; # eliminar en v2, restaurar en v3.		

Las Tablas 9 y 10 exponen claves de la numeración de Kabat para las diversas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Tabla 9: Clave para la numeración de Kabat para la cadena ligera

KAB nº	Nº	TIPO	VL de 12B4 de ratón	VL de 12B4 HUM	KABID 005036	Línea germinal de A19	Comentario
1	1	FR1 D		D	D	D	
2	2		V	V	I	I	canónico - retromutar en v1, v2 y v3
3	3		L	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	
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	
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	

ES 2 389 541 T3

(continuación)

KAB nº	Nº	TIPO	VL de 12B4 de ratón	VL de 12B4 HUM	KABID 005036	Línea germinal de A19	Comentario
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		N	N	S	S	
27B	29		I	I	L	L	
27C	30		V	V	L	L	
27D	31		H	H	H	H	
27E	32		S	S	R	S	
28	33		N	N	Y	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	
37	42		L	L	L	L	
38	43		Q	Q	Q	Q	
39	44		K	K	K	K	
40	45		P	P	P	P	
41	46		G	G	G	G	
42	47		Q	Q	Q	Q	
43	48		S	S	S	S	
44	49		P	P	P	P	
45	50		K	Q	Q	Q	
46	51		L	L	L	L	
47	52		L	L	L	L	

ES 2 389 541 T3

(continuación)

KAB nº	Nº	TIPO	VL de 12B4 de ratón	VL de 12B4 HUM	KABID 005036	Línea germinal de A19	Comentario
48	53		I	I	I	I	
49	54		Y	Y	Y	Y	
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	
65	70		S	S	S	S	
66	71		G	G	G	G	
67	72		S	S	S	S	
68	73		G	G	G	G	
69	74		T	T	T	T	
70	75		D	D	D	D	
71	76		F	F	F	F	
72	77		T	T	T	T	
73	78		L	L	L	L	
74	79		K	K	K	K	
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	

ES 2 389 541 T3

(continuación)

KAB nº	Nº	TIPO	VL de 12B4 de ratón	VL de 12B4 HUM	KABID 005036	Línea germinal de A19	Comentario
82	87		D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	
85	90		V	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	
88	93		C	C	C	C	
89	94	CDR3	F	F	M	M	
90	95		Q	Q	Q	Q	
91	96		G	G	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		
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		

Tabla 10. Clave para la numeración de Kabat para la cadena pesada

KAB nº	Nº	TIPO -	VH de 12B4 de ratón	VH de 12B4v1 HUM	KABID 000333	Línea germinal de VH4-39	Línea germinal de VH4-61	Comentario
1	1	FR1	Q	Q	Q	Q	Q	
2	2		V	V	L	L	V	vernier - sólo retromutar en v1
3	3		T	Q	Q	Q	Q	

ES 2 389 541 T3

(continuación)

KAB nº	Nº	TIPO -	VH de 12B4 de ratón	VH de 12B4v1 HUM	KABID 000333	Línea germinal de VH4-39	Línea germinal de VH4-61	Comentario
4	4		L	L	L	L	L	
5	5		K	Q	Q	Q	Q	
6	6		E	E	E	E	E	
7	7		S	S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	G	
9	9		P	P	P	P	P	
10	10		G	G	G	G	G	
11	11		I	L	L	L	L	
12	12		L	V	V	V	V	
13	13		Q	K	K	K	K	
14	14		P	P	P	P	P	
15	15		S	S	S	S	S	
16	16		Q	E	E	E	E	
17	17		T	T	T	T	T	
18	18		L	L	L	L	L	
19	19		S	S	S	S	S	
20	20		L	L	L	L	L	
21	21		T	T	T	T	T	
22	22		C	C	C	C	C	
23	23		S	T	T	T	T	
24	24		F	F	V	V	V	canónico - retromutar en v1, v2 y v3
25	25		S	S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	G	
27	27		F	F	G	G	G	canónico - retromutar en v1, v2 y v3
28	28		S	S	S	S	S	
29	29		L	L	I	I	V	canónico - retromutar en v1, v2 y v3
30	30		S	S	S	S	S	
31	31	CDR1	T	T	R	S	S	
32	32		N	N	G	S	G	
33	33		G	G	S	S	G	
34	34		M	M	H	Y	Y	

ES 2 389 541 T3

(continuación)

KAB nº	Nº	TIPO -	VH de 12B4 de ratón	VH de 12B4v1 HUM	KABID 000333	Línea germinal de VH4-39	Línea germinal de VH4-61	Comentario
35	35		G	G	Y	Y	Y	
35A	36		V	V	W	W	W	
35B	37		S	S	G	G	S	
36	38	FR2	W	W	W	W	W	
37	39		I	I	I	I	I	
38	40		R	R	R	R	R	
39	41		Q	Q	Q	Q	Q	
40	42		P	P	P	P	P	
41	43		S	P	P	P	P	
42	44		G	G	G	G	G	
43	45		K	K	K	K	K	
44	46		G	G	G	G	G	
45	47		L	L	L	L	L	
46	48		E	E	E	E	E	
47	49		W	W	W	W	W	
48	50		L	L	I	I	I	vernier - sólo retromutar en v1 y v3
49	51		A	A	G	G	G	vernier - sólo retromutar en v1
50	52	CDR2	H	H	S	S	Y	
51	53		I	I	I	I	I	
52	54		Y	Y	Y	Y	Y	
53	55		W	W	Y	Y	Y	
54	56		D	D	S	S	S	
55	57		E	E	G	G	G	
56	58		D	D	N	S	S	
57	59		K	K	T	T	T	
58	60		R	R	Y	Y	N	
59	61		Y	Y	F	Y	Y	
60	62		N	N	N	N	N	
61	63		P	P	P	P	P	
62	64		S	S	S	S	S	

ES 2 389 541 T3

(continuación)

KAB nº	Nº	TIPO -	VH de 12B4 de ratón	VH de 12B4v1 HUM	KABID 000333	Línea germinal de VH4-39	Línea germinal de VH4-61	Comentario
63	65		L	L	L	L	L	
64	66		K	K	K	K	K	
65	67		S	S	S	S	S	
66	68	FR3	R	R	R	R	R	
67	69		L	L	V	V	V	vernier - sólo retromutar en v1
68	70		T	T	T	T	T	
69	71		I	I	I	I	I	
70	72		S	S	S	S	S	
71	73		K	K	V	V	V	canónico - retromutar en v1, v2 y v3
72	74		D	D	D	D	D	
73	75		T	T	T	T	T	
74	76		S	S	S	S	S	
75	77		N	K	K	K	K	
76	78		N	N	N	N	N	
77	79		Q	Q	Q	Q	Q	
78	80		V	V	F	F	F	vernier - retromutar en v1 y v3
79	81		F	S	S	S	S	
80	82		L	L	L	L	L	
81	83		K	K	K	K	K	
82	84		I	L	L	L	L	
82A	85		T	S	S	S	S	
82B	86		N	S	S	S	S	
82C	87		V	V	V	V	V	
83	88		D	T	T	T	T	
84	89		T	A	A	A	A	
85	90		A	A	A	A	A	
86	91		D	D	D	D	D	
87	92		T	T	T	T	T	
88	93		A	A	A	A	A	
89	94		T	V	V	V	V	
90	95		Y	Y	Y	Y	Y	

ES 2 389 541 T3

(continuación)

KAB nº	Nº	TIPO -	VH de 12B4 de ratón	VH de 12B4v1 HUM	KABID 000333	Línea germinal de VH4-39	Línea germinal de VH4-61	Comentario
91	96		Y	Y	Y	Y	Y	
92	97		C	C	C	C	C	
93	98		A	A	A	A	A	
94	99		R	R	R	R	R	
95	100	CDR3	R	R	L			
95A	-		-	-	G			
96	101		R	R	P			
97	102		I	I	D			
98	103		I	I	D			
99	104		Y	Y	Y			
100	105		D	D	T			
100A	106		V	V	L			
100B	107		E	E	D			
100C	108		D	D	G			
100D	109		Y	Y	-			
100E	110		F	F	M			
101	111		D	D	D			
102	112		Y	Y	V			
103	113	FR4	W	W	W			
104	114		G	G	G			
105	115		Q	Q	Q			
106	116		G	G	G			
107	117		T	T	T			
108	118		T	T	T			
109	119		L	V	V			
110	120		T	T	T			
111	121		V	V	V			
112	122		S	S	S			
113	123		S	S	S			

Los anticuerpos humanizados presentan preferentemente una afinidad de unión específica por A β de al menos 10⁷, 10⁸, 10⁹ ó 10¹⁰ M⁻¹. Normalmente, el límite superior de la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados por A β está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la de 12B4 (es decir, ~10⁹ M⁻¹). Frecuentemente, el límite inferior de la afinidad de unión también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de la de 12B4.

5

Ensamblaje y expresión de VH y VL de 12B4 humanizado, versión 1. La Figura 9a es una representación esquemática de la estrategia para el ensamblaje mediado por PCR de VL.v1 humanizado. La Figura 9b es una

representación esquemática de la estrategia para el ensamblaje mediado por PCR de VH.v1 humanizado. La Tabla 11 expone cebadores usados para el ensamblaje mediado por PCR de 12B4v1.

Tabla 11: Oligonucleótidos sintéticos usados en el ensamblaje mediado por PCR de regiones V de 12B4 humanizado, v1

ADN nº	Tamaño	¿Cadena codificante?	Secuencia	Comentarios
4881	135	Sí	gagattaagcttgccgccaccATGAGGCT CCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAAGC TCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATGTT GTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCG	Cebador hum12B4 VLv1A sintetizado por Oligos etc. nts 1>115 12B4VLv1.cons, cadena codificante. Añade sitio HindIII + consenso de Kozak.
			SEC ID Nº: 13	
4882	131	No	AGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCTG CAGGTACCATTCCAATAGGTGTTTCCAT TACTATGAACAATGTTCTGACTAGACCTG CAGGAGATGGAGGCCGGCTCTCCAGGGGT GACGGGCAGGAGAG	Cebador hum12B4 VLv1B sintetizado por Oligos etc. ADN del complemento inverso Secuencia 12B4VLv1.cons(85.215)
			SEC ID Nº: 14	
4883	132	Sí	TGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTC CTGATCTACAAGTTTCCAACCGATTTTC TGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTG GATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTG	Cebador hum12B4 VLv1C sintetizado por Oligos etc. nts 185>316 12B4VLv1.cons, cadena codificante.
			SEC ID Nº: 15	
4884	130	No	tgatatggatccactcacGTTTGATCTCC AGCTTGGTCCCTGACCGAAGCTGAGCGG AACATGTGAACCTTGAAGCAGTAATAAA CCCCAACATCTCAGCCTCCACTCTGCTG ATTTTCAGTGATAA	Cebador hum12B4 VLv1D sintetizado por Oligos etc. ADN del complemento inverso Secuencia 12B4VLv1.cons (286.397) añade donante de corte y empalme + sitio BamHI.
			SEC ID Nº: 16	
4885	143	Sí	gagataaagcttgccgccaccATGAAGCA CCTGTGGTCTCTCCTCCTGCTGGTGGCAG CTCCCAGATGGTCTCTCCCAGGTGCAG CTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGGAGACCTGTCCCTCACCTG	Cebador hum12B4 VHv1A sintetizado por Oligos etc. 12B4VHv1.cons nts 1-122, añade consenso de Kozak y sitio HindIII
			SEC ID Nº: 17	
4886	137	No	TCTCATCCCAATAGATGTGTGCCAGCCA CTCCAGTCCCTTCCCTGGGGCTGCCGGA TCCAGCTCACACCCATACCATAGTGCTC AGGGAAAACAGAGAAAGTGCAGGTGAG GGACAGGGTCTCCGAAGGCTT	Cebador hum12B4 VHv1B sintetizado por Oligos etc. ADN del complemento inverso Secuencia 12B4VHv1.cons (94.230)
			SEC ID Nº: 1B	
4887	138	Sí	GTGGCTGGCACACATCTATGGGATGAGG ACAAGCGTATAACCCATCCCTCAAGAGT CGACTCACCATATCAAAGGACACGTCCAA GAACCAGGTATCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCTGCAGACACGGCCGT	Cebador hum12B4 VHv1C sintetizado por Oligos etc. 12B4VHv1.cons nts 201-338
			SEC ID Nº: 19	
4888	139	No	tcatatggatccactcacCTGAGGAGACG GTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAGTC AAAGTAGTCTCAACATCATAGATGATCC TCCTTCTCGCACAGTAATACACGGCCGTG TCTGCAGCGGTACAGAGCTCAG	Cebador hm12B4 VHv1D sintetizado por Oligos etc. ADN del complemento inverso Secuencia 12B4VHv1.cons (307.427) añade donante de corte y empalmen + sitio BamHI al extremo 3'.
			SEC ID Nº: 20	

ES 2 389 541 T3

(continuación)

ADN nº	Tamaño	¿Cadena codificante?	Secuencia	Comentarios
4889	22	Sí	gag att aag ctt gcc gcc acc A	hum 12B4 VLv1, A+B para el cebador % de A+T = 45,45 [10]; % de C+G = 54,55 [12] Davis, Botstein, Roth Temp fusión C. 64,54
			SEC ID Nº: 21	
4890	21	No	AGG AGC TGT GGA GAC TGC CCT	hum 12B4 VLv1, A+B para el cebador % de A+T = 38,10 [8]; % de C+G = 61,90 [13] Davis, Botstein, Roth Temp fusión C. 66,47
			SEC ID Nº: 22	
4891	20	Sí	TGC AGA AGC CAG GGC AGT CT	hum 12B4 VLv1, C+D para el cebador % de A+T = 40,00 [8]; % de C+G = 60,00 [12] Davis, Botstein, Roth Temp fusión C. 64,50
			SEC ID Nº: 23	
4892	28	No	tga tat gga tcc act cac GTT TGA TCT C	hum 12B4 VLv1, C+D para el cebador % de A+T = 57,14 [16]; % de C+G = 42,86 [12] Davis, Botstein, Roth Temp fusión C. 64,61
			SEC ID Nº: 24	
4893	23	Sí	gag ata aag ctt gcc gcc acc AT	hum 12B4 VHv1, A+B para el cebador % de A+T = 47,83 [11]; % de C+G = 52,17 [12] Davis, Botstein, Roth Temp fusión C. 64,55
			SEC ID Nº: 25	
4894	24	No	TCC TCA TCC CAA TAG ATG TGT GCC	hum 12B4 VH1, A+B para el cebador % de A+T = 50,00 [12]; % de C+G = 50,00 [12] Davis, Botstein, Roth Temp fusión C. 64,57
			SEC ID Nº: 26	
4895	22	Sí	GTG GCT GGC ACA CAT CTA TTG G	hum 12B4 VHv1, C+D para el cebador % de A+T = 45,45 [10]; % de C+G = 54,55 [12] Davis, Botstein, Roth Temp fusión C. 64,54
			SEC ID Nº: 27	
4896	24	No	tca tat gga tcc act cac CTG AGG	hum 12B4 VHv1, C+D para el cebador % de A+T = 50,00 [12]; % de C+G = 50,00 [12] Davis, Botstein, Roth Temp fusión C. 64,57
			SEC ID Nº: 28	

5 Relaciones equimolares de los fragmentos sintéticos VHv1A+VHv1B y VHv1C+VHv1D se hibridaron como pares en tubos de reacción separados usando procedimientos convencionales. La reacción de hibridación de A+B se ensambló usando PCR con cebadores A+B dir y A+B inv a 60 °C de hibridación, 25 ciclos (dir = directo e inv = inverso). Asimismo, la reacción de hibridación de C+D se ensambló usando cebadores de PCR C+D dir y C+D inv bajo condiciones idénticas. La mitad de A+B de 5' y la mitad de C+D de 3' ensambladas por PCR se purificaron en gel para una ensamblaje mediado por PCR final. El ensamblaje de la región V completa se efectuó mezclando la mitad de 5' ensamblada con A+B con la mitad de 3' de C+D de la región V, hibridando y extendiendo por PCR usando el cebador dir VHv1 A+B y el cebador inv VHv1C+D. Las regiones VH y VL de longitud completa
10 ensambladas de este modo se purificaron en gel y se clonaron en pCRScript para la verificación de secuencias de ADN.

Las secuencias de nucleótidos de 12B4VL humanizado (versión 1) (SEC ID N°: 5) y 12B4VH (versión 1) (SEC ID N°: 7) se enumeran a continuación como las Tablas 12 y 13, respectivamente.

Tabla 12. Secuencia de nucleótidos de 12B4VLv1 humanizado.

```
ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGG
GGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCT
CCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAACATTGTTTCATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAA
TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCG
ATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGA
AAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACAT
GTTCCGCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC
```

Tabla 13. Secuencia de nucleótidos de 12B4VHv1 humanizado

```
ATGAAGCACCTGTGGTCTTCCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTCCTGTCCCA
GGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCCTCA
CCTGCACTTTCTCTGGTTTTTCCCTGAGCACTAATGGTATGGGTGTGAGCTGGATCCGG
CAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACACATCTATTGGGATGAGGACAAGCG
CTATAACCCATCCCTCAAGAGTCGACTCACCATATCAAAGGACACGTCACCAAGACCAGG
TATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCAGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGA
AGGAGGATCATCTATGATGTTGAGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCCTCAG
```

SEC ID N°: 10

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

15

SEC ID Nº: 12

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

B. Anticuerpo 12B4 humanizado versión 2

5 Se creó una segunda versión de 12B4 humanizado que tenía cada una de las sustituciones indicadas para la versión 1, excepto la sustitución de L→V en el residuo 2, la sustitución de I→7 L en el residuo 48, la sustitución de G→A en el residuo 49, la sustitución de V→L en el residuo 67 y la sustitución de F→V en el residuo 78. Las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras de 12B4 humanizado versión 2 se exponen como SEC ID Nº: 5. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas de 12B4 humanizado versión 2 se exponen como SEC ID Nº: 6 y 10, respectivamente.

C. Anticuerpo 12B4 humanizado versión 3

10 Se creó una tercera versión de 12B4 humanizado que tenía cada una de las sustituciones indicadas para la versión 1, excepto la sustitución de L→V en el residuo 2, la sustitución de G→A en el residuo 49 y la sustitución de V→L en el residuo 67. Las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras de 12B4 humanizado versión 3 se exponen como SEC ID Nº: 5. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas de 12B4 humanizado versión 3 se exponen como SEC ID Nº: 6 y 12, respectivamente.

15 Ejemplo VI. Prevención y tratamiento de sujetos humanos

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

20 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 EA probable. Pacientes adecuados puntúan en el intervalo de 12-26 en el miniexamen del estado mental (MMSE). Otros criterios de selección son que sea probable que los pacientes sobrevivan a la duración del estudio y carezcan de asuntos complicados tales como el uso de medicaciones concomitantes que puedan interferir. Se hacen evaluaciones del nivel inicial de la función del paciente usando medidas psicométricas clásicas tales como MMSE y ADAS, que es una escala global 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 de vida cualitativas adecuadas para monitorizar el tratamiento. La progresión de la enfermedad también puede monitorizarse por RMN. También pueden monitorizarse perfiles de la sangre de pacientes, que incluyen ensayos de anticuerpos específicos para inmunogén y respuestas de linfocitos T.

30 Tras las mediciones del nivel inicial, los pacientes empiezan a recibir tratamiento. Se aleatorizan y se tratan con tanto agente terapéutico como placebo de un modo ciego. Los pacientes se monitorizan al menos cada seis meses. La eficacia se determina por una reducción significativa en la progresión de un grupo de tratamiento con respecto a un grupo de placebo.

35 Se realiza un segundo ensayo de fase II para evaluar la conversión de pacientes de pérdida de memoria temprana por enfermedad de no Alzheimer, denominado algunas veces deterioro de la memoria asociado a la edad (DMAE) o

deterioro cognitivo leve (DCL), en enfermedad de Alzheimer probable como se define por los criterios de ADRDA. Los pacientes con alto riesgo de conversión en enfermedad de Alzheimer se seleccionan de una población no clínica cribando poblaciones de referencia para signos tempranos de pérdida de memoria u otras dificultades asociadas a sintomatología pre-Alzheimer, una historia familiar de enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genéticos, edad, sexo y otra muestra encontrada para predecir alto riesgo para enfermedad de Alzheimer. Se recogen puntuaciones del nivel inicial en métrica adecuada que incluyen MMSE y ADAS junto con otra métrica diseñada para evaluar una población más normal. Estas poblaciones de pacientes se dividen en grupos adecuados con comparación de placebo contra alternativas de dosificación con el agente. Estas poblaciones de pacientes son seguidas a intervalos de aproximadamente seis meses, y el criterio de valoración para cada paciente es si se convierte o no en enfermedad de Alzheimer probable como se define por los criterios de ADRDA al final de la observación.

Aunque la anterior invención se ha descrito en detalle para los fines de claridad del entendimiento, será obvio que pueden ponerse en práctica ciertas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

De lo anterior será evidente que la invención proporciona varios usos. Por ejemplo, la invención proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos para A β descritos anteriormente en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de enfermedad amiloidogénica, o en la fabricación de una composición de medicamento o diagnóstico para su uso en la misma.

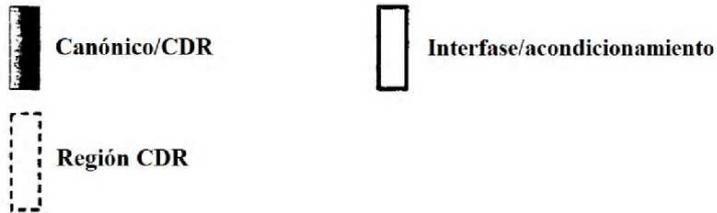
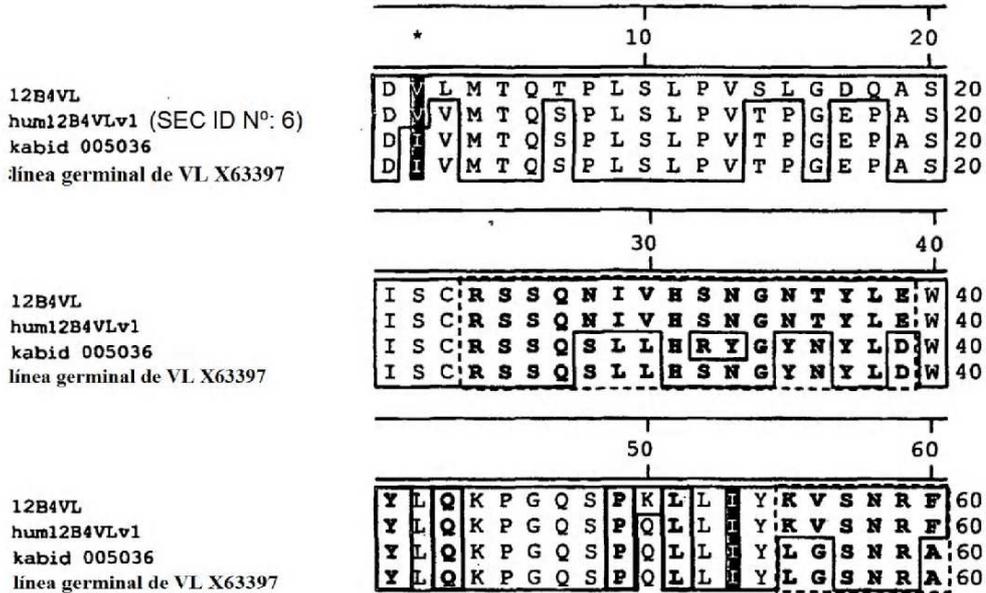
REIVINDICACIONES

1. Una inmunoglobulina o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a péptido beta-amiloide (A β) que comprende (i) una secuencia de la cadena ligera variable madura que comprende los aminoácidos 20-131 de SEC ID N^o: 2 y una secuencia de la cadena pesada variable madura que comprende los aminoácidos 20-142 de SEC ID N^o: 4, o (ii) una cadena ligera variable humanizada que comprende tres CDR de SEC ID N^o: 2 asignadas según Kabat y una cadena pesada variable humanizada que comprende tres CDR de SEC ID N^o: 4 asignadas según Kabat, en la que la inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de la misma se une a un epítipo dentro de los residuos 3-7 de péptido beta-amiloide (A β) y se une a péptido beta-amiloide (A β) soluble y agregado.
2. Una inmunoglobulina quimérica o un fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de la región variable de la cadena ligera expuesta en SEC ID N^o: 2 y la secuencia de la región variable de la cadena pesada expuesta en SEC ID N^o: 4, y secuencias de la región constante de una inmunoglobulina humana.
3. Una inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 1, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, comprendiendo la inmunoglobulina humanizada:
- (i) una cadena ligera humanizada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable asignadas según Kabat de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina expuesta como SEC ID N^o: 2 y una región estructural variable de una secuencia de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina aceptora humana;
- y
- (ii) una cadena pesada humanizada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable asignadas según Kabat de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina expuesta como SEC ID N^o: 4 y una región estructural variable de una secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina aceptora humana.
4. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 3, en la que las CDR de la cadena ligera tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:
- CDR1 de la cadena ligera:
Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu (residuos 43-58 de SEC ID N^o: 2),
- CDR2 de la cadena ligera:
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (residuos 74-80 de SEC ID N^o: 2),
- CDR3 de la cadena ligera:
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr (residuos 113-121 de SEC ID N^o: 2); y
- en la que las CDR de la cadena pesada tienen las siguiente secuencias de aminoácidos:
- CDR1 de la cadena pesada:
Thr Asn Gly Met Gly Val Ser (residuos 50-56 de SEC ID N^o: 4),
- CDR2 de la cadena pesada:
His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser (residuos 71-86 de SEC ID N^o: 4),
- CDR3 de la cadena pesada:
Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr (residuos 119-131 de SEC ID N^o: 4).
5. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 4, en la que al menos un residuo de la región estructural en al menos una de la cadena ligera o la pesada está sustituido con el residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de 12B4 de ratón expuesta como SEC ID N^o: 2 o la secuencia de la región variable de la cadena pesada de 12B4 de ratón expuesta como SEC ID N^o: 4, en la que el residuo de la región estructural es:
- (a) un residuo que se une directamente de manera no covalente a antígeno;
- (b) un residuo adyacente a CDR;
- (c) un residuo de interacción con CDR; o
- (d) un residuo que puede afectar la conformación o la función de la región variable de la cadena ligera como se identifica por análisis de un modelo tridimensional de la región variable.

6. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 5, en la que el al menos un residuo de la región estructural es
- (a) un residuo que puede interactuar con antígeno;
 - (b) un residuo proximal al sitio de unión a antígeno;
 - 5 (c) un residuo dentro de 6 Å de un residuo de CDR;
 - (d) un residuo canónico;
 - (e) un residuo de la zona vernier;
 - (f) un residuo de acondicionamiento entre cadenas;
 - 10 (g) un residuo raro;
 - (h) un residuo de glucosilación sobre la superficie del modelo estructural.
7. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en la que la cadena ligera de la inmunoglobulina aceptora humana comparte al menos el 90 % de identidad de secuencias con la cadena ligera de 12B4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2.
8. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en la que la cadena pesada de la inmunoglobulina aceptora humana comparte al menos el 90 % de identidad de secuencias con la cadena pesada de 12B4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4.
9. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en la que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y el residuo de la región estructural variable L2 según la convención de numeración de Kabat son de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 12B4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, y en la que el resto de la cadena ligera es de una inmunoglobulina humana.
- 20 10. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en la que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y los residuos de la región estructural variable H2, H24, H27, H29, H48, H49, H67, H71 y H78 según la convención de numeración de Kabat son de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 12B4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, y en la que el resto de la cadena pesada es de una inmunoglobulina humana.
- 25 11. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en la que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y los residuos de la región estructural variable H24, H27, H29 y H71 según la convención de numeración de Kabat son de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 12B4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, y en la que el resto de la cadena pesada es de una inmunoglobulina humana.
- 30 12. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en la que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y los residuos de la región estructural variable H24, H27, H29, H48, H71 y H78 según la convención de numeración de Kabat son de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 12B4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, y en la que el resto de la cadena pesada es de una inmunoglobulina humana.
- 35 13. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 3-12, en la que la región variable de la cadena ligera es como se expone en los residuos 1-112 de SEC ID N°: 6.
- 40 14. La inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 3-13, en la que la región variable de la cadena pesada es como se expone en los residuos 1-123 de SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12.
15. La inmunoglobulina humanizada de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14 que comprende una región Fc que tiene una función efectora alterada.
16. El fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que es un fragmento Fab.
- 45 17. La inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que se une específicamente a péptido beta-amiloide (A β) con una afinidad de unión de como máximo 10⁻⁷ M, preferentemente como máximo 10⁻⁸ M, más preferentemente como máximo 10⁻⁹ M.
18. La inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que el isotipo de la cadena pesada es gamma 1.
- 50 19. La inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 que media en la fagocitosis de péptido beta-amiloide (A β).
20. La inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 que cruza la barrera hematoencefálica en un sujeto.

21. La inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 que reduce la carga de péptido beta-amiloide (A β) de placas en un sujeto.
22. La inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para su uso en terapia.
- 5 23. La inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para prevenir o tratar una enfermedad amiloidogénica o para prevenir o tratar enfermedad de Alzheimer o para prevenir o tratar una enfermedad asociada a depósitos de amiloide de A β en el cerebro de un paciente, por ejemplo, una enfermedad caracterizada por deterioro cognitivo, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down o deterioro cognitivo leve en un sujeto que lo necesita.
- 10 24. Una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un vehículo farmacéutico.
25. La composición de la reivindicación 24 que está adaptada para proporcionar una dosificación eficaz de dicha inmunoglobulina o fragmento de al menos 1 mg/kg de peso corporal, preferentemente al menos 10 mg/kg de peso corporal.
- 15 26. La composición de la reivindicación 24 o de la reivindicación 25, en la que el anticuerpo está adaptado para administrarse por vía intraperitoneal, oral, intranasal, subcutánea, intramuscular, tópica o intravenosa.
27. Una molécula de ácido nucleico aislada o moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la inmunoglobulina o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
- 20 28. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una secuencia madura y comprende los nucleótidos 58-393 de SEC ID N $^{\circ}$: 1; los nucleótidos 61-396 de SEC ID N $^{\circ}$: 5; los nucleótidos 58-426 de SEC ID N $^{\circ}$: 3; o los nucleótidos 58-426 de SEC ID N $^{\circ}$: 7.
29. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 27 o de la reivindicación 28.
30. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 27 o de la reivindicación 28.
- 25 31. Un animal transgénico no humano que expresa un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 27 o de la reivindicación 28.
32. El animal transgénico no humano de la reivindicación 31, en el que el polipéptido se expresa en la leche de dicho animal.
- 30 33. Un procedimiento de producir una inmunoglobulina, o fragmento de la misma, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 30 en condiciones tales que se produzca la inmunoglobulina o el fragmento y aislar dicha inmunoglobulina de la célula huésped o del cultivo.
34. Una inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-21 para su uso en un procedimiento *in vivo* de diagnosticar o confirmar el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer o susceptibilidad a la misma por medio de la obtención de imágenes de depósitos de amiloide en el cerebro de un paciente.

FIG. 1A

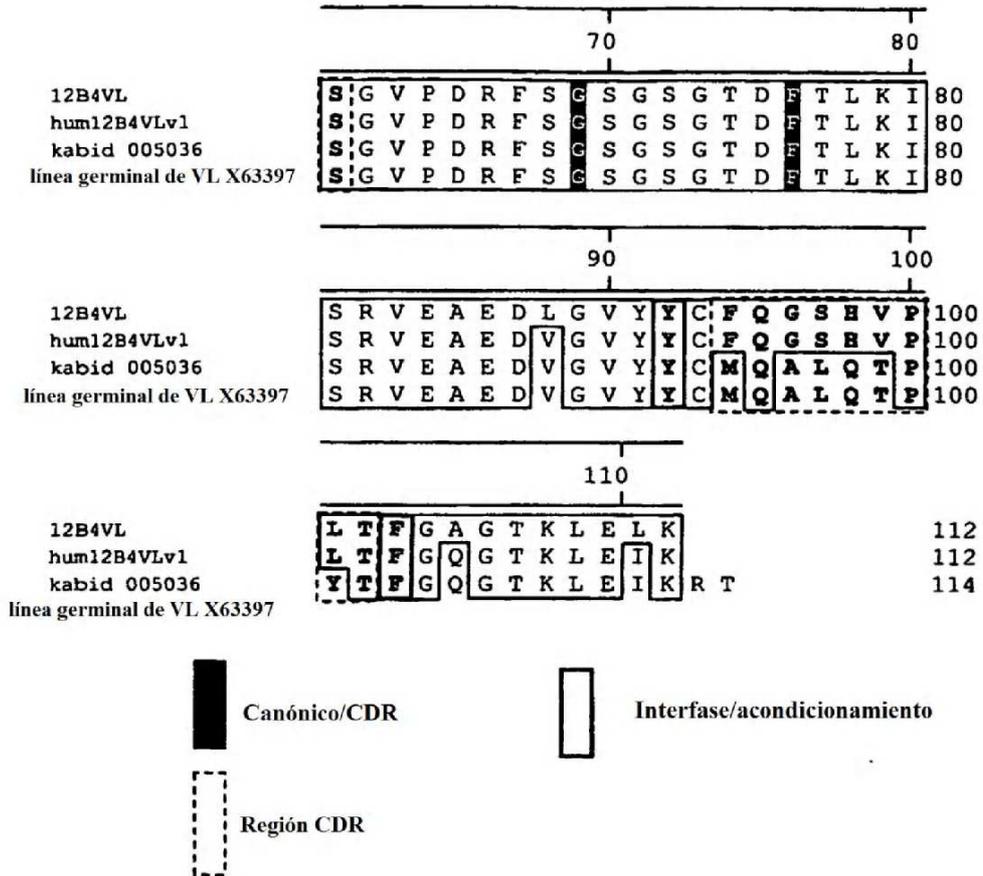


* retromutación única de un residuo humano
→ de ratón

Decoración: residuos recuadrados que coinciden con 12B4VH exactamente.

<1> (SEC ID N°: 6)

FIG. 1B



* retromutación única
de un residuo humano → de ratón

Decoración: residuos recuadrados que
coinciden con 12B4VH exactamente.

FIG. 3B

	130		160		40
ch12B4VL	I S C R S S Q N I V H S N G N T Y L E W				
12B4VLv1	ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC AAT GTT CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG				177
línea germinal de VL X63397	I S C R S S Q N I V H S N G N T Y L E W				40
X67904 K005036 VL	ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AAC AAT GTT CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTG GAA TGG				180
	I S C R S S Q S L L L H S N G Y N Y L D W				40
	ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG CAT AGT AAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG				180
	I S C R S S Q S L L H R Y G Y N Y L D W				40
	ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG CAT CGT TAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG				120
	190		220		
ch12B4VL	Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F				60
12B4VLv1	TAC CTG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT				237
línea germinal de VL X63397	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F				60
X67904 K005036 VL	TAC CTG CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT				240
	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A				60
	TAC CTG CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT AAT CGG GCC				240
	Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A				60
	TAC CTG CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT AAT CGG GCC				180

FIG. 3C

	250		280			80
ch12B4VL	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I		TTC ACA CTC AAG ATC			297
12B4VLv1	TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT		TTC ACA CTC AAG ATC			80
línea germinal de VL X63397	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I		TTC ACA CTC AAG ATC			300
X67904 K005036 VL	TCT GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA GAT		TTC ACA CTC AAG ATC			80
	TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA GAT		TTC ACA CTC AAG ATC			300
	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I		TTC ACA CTC AAG ATC			80
	TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA GAT		TTC ACA CTC AAG ATC			240
	310		340			
dh12B4VL	S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P		GGT TCA CAT GTT CCG			100
12B4VLv1	AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TAC TGC TTT CAA GGT TCA CAT GTT CCG		GGT TCA CAT GTT CCG			357
línea germinal de VL X63397	S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H V P		GGT TCA CAT GTT CCG			100
X67904 K005036 VL	AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC TGC TTT CAA GGT TCA CAT GTT CCG		GGT TCA CAT GTT CCG			360
	S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P		GGT TCA CAT GTT CCG			100
	AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAA ACT CCT		GGT TCA CAT GTT CCG			360
	S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P		GGT TCA CAT GTT CCG			100
	AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAA ACT CCG		GGT TCA CAT GTT CCG			300

FIG. 3D

370											
L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K
CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AGC	CTG	GAG	CTG	AAA
L	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
CTC	ACG	TTC	GGT	CAG	GGG	ACC	AGC	CTG	GAG	ATC	AAA

12B4VL

12B4VLv1

línea germinal de VL X63397

67904 K005036 VL

112
393
112
396

Decoración: residuos recuadrados que coinciden con 12B4VLv1.cons exactamente.

FIG. 4A

ch12B4VH

12B4VHv1

X54437 KAB000333 VH

línea germinal de VH-61 BAA75026

M	D	R	L	T	S	S	P	L	L	L	I	V	P	A	Y	V	L	S	Q	1	
ATG	GAC	AGG	CTT	ACT	TCC	TCA	TTC	CTG	CTG	CTG	ATT	GTC	CCT	GCA	TAT	GTC	TCC	CAG	60		
M	K	H	L	W	F	F	L	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	S	Q	1	
ATG	AAG	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTG	CTG	CTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	CAG	60	
-	-	-	-	-	-	-	-	L	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	S	Q	1
-	-	-	-	-	-	-	-	CTC	CTG	CTG	GCG	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	CAG	39	
M	K	H	L	W	F	F	L	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	S	Q	1	
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTG	CTG	CTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	CAG	60	

ch12B4VH

12B4VHv1

X54437 KAB000333 VH

línea germinal de VH-61 BAA75026

V	T	L	K	E	S	G	P	G	I	L	Q	P	S	Q	T	L	S	L	T	21
GTT	ACT	CTG	AAA	GAG	TCT	GGC	CCT	GGG	ATA	TTG	CAG	CCC	TCC	CAG	ACC	CTC	AGT	CTG	ACT	120
V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	21
GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	120
L	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	21
CTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	99
V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	21
GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	120

FIG. 4B

ch12B4VH

12B4VHv1

X54437 KAB000333 VH

línea germinal de VH-61 BAA75026

C	S	F	S	G	F	S	L	S	T	N	G	M	G	V	S	W	I	R	Q	41
TGT	TCT	TTC	TCT	GGG	TTT	TCA	CTG	AGC	ACT	AAT	GGT	ATG	GGT	GTG	AGC	TGG	ATT	CGT	CAG	180
C	T	F	S	G	F	S	L	S	T	N	G	M	G	V	S	W	I	R	Q	41
TGC	ACT	TTC	TCT	GGT	TTT	TCC	CTG	AGC	ACT	AAT	GGT	ATG	GGT	GTG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	180
C	T	V	S	G	G	S	I	S	R	G	S	H	Y	W	G	W	I	R	Q	41
TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	AGA	GGT	AGT	CAC	TAC	TGG	GGC	TGG	ATC	CGC	CAG	159
C	T	V	S	G	G	S	V	S	S	G	G	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	41
TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	GTC	AGC	AGT	GGT	GAT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	180

ch12B4VH

12B4VHv1

X54437 KAB000333 VH

línea germinal de VH-61 BAA75026

P	S	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	W	D	E	D	K	R	Y	61
CCT	TCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG	CAC	ATT	TAC	TGG	GAT	GAG	GAC	ANG	CGC	TAT	TAT	240
P	P	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	Y	W	D	E	D	K	R	Y	61
CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	CTG	GCA	CAC	ATC	TAT	TGG	GAT	GAG	ANG	CGC	TAT	TAT	240
P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	S	I	Y	Y	S	G	N	T	Y	F	61
CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	AGT	ATC	TAT	TAT	ACT	GGG	AAC	ACC	TAC	TTT	219
P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	N	Y	61
CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAT	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	240

FIG. 4C

	280		310				
ch12B4VH	N P S L K S R L T I S K D T S N N Q V F 81		AAC CCA TCC CTG AAG AGC CGG CTC ACA ATC TCC AAG GAT ACC TCT AAC AAT CAG GTA TTC 300				
12B4VHv1	N P S L K S R L T I S K D T S K N Q V S 81		AAC CCA TCC CTC AAG AGT CGA CTC ACC ATA TCA AAG GAC ACG TCC AAG AAC CAG GTA TCC 300				
X54437 KAB000333 VH	N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S 81		AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCT GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC 279				
línea germinal de VH-61 BAA75026	N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S 81		AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC 300				
	340		370				
ch12B4VH	L K I T N V D T A D T A T Y Y C A R R 101		CTC AAG ATC ACC AAT GTG GAC ACT GCT GAT ACT GCC ACA TAC TAC TGT GCT CGA AGG AGG 360				
12B4VHv1	L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R R 101		CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCT GCA GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA AGG AGG 360				
X54437 KAB000333 VH	L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R L G 101		CTG AAG CTG ACC TCT GTG ACC GCC GCA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CTC GGC 339				
línea germinal de VH-61 BAA75026	L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R 99		CTG AAG CTG ACC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA 354				

FIG. 4D

ch12B4VH	I I Y D V E D Y F D Y W G Q G T L T V	121
12B4VHv1	ATC ATC TAT GAT GTT GAG GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC	420
X54437 KAB000333 VH	I I Y D V E D Y F D Y W G Q G T V T V	121
línea germinal de VH-61 BAA75026	ATC ATC TAT GAT GTT GAG GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACC GTC ACC GTC	420
	P D D Y T L D G H D V W G Q G T V T V	121
	CCT GAT GAC TAT ACC CTT GAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGC ACC ACC GTC ACC GTC	399

ch12B4VH	S S	123
12B4VHv1	TCC TCA	426
X54437 KAB000333 VH	S S	123
línea germinal de VH-61 BAA75026	TCC TCA	426
	S S	123
	TCC TCA	405

Decoración: residuos recuadrados que coinciden con 12B4VHv1, cons exactamente.

FIG. 5A

ELISA de A β 42

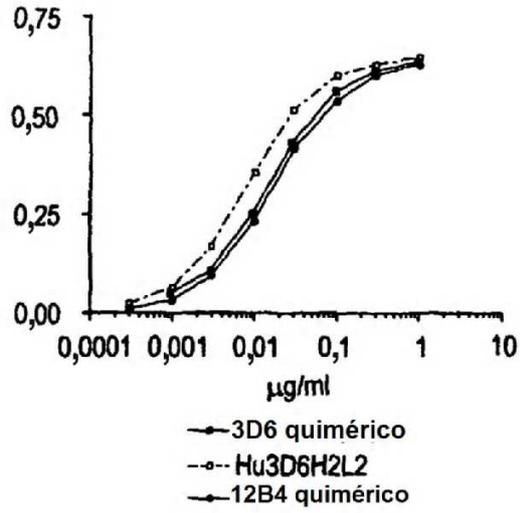


FIG. 5B

ELISA de A β 42

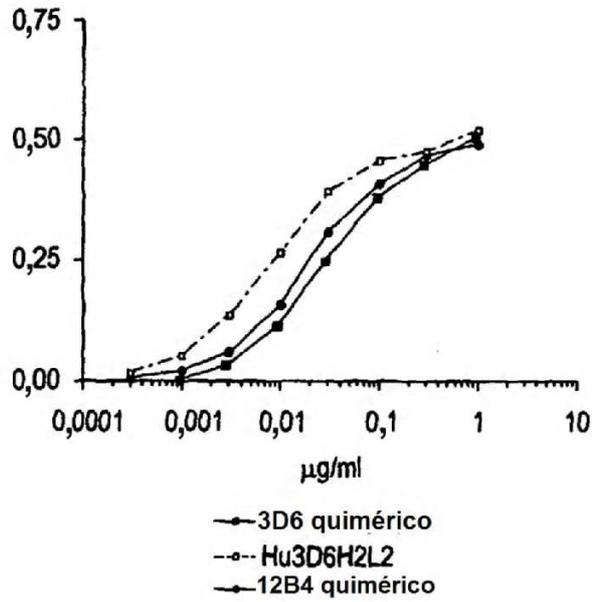


FIG. 6

Competencia de A β 42

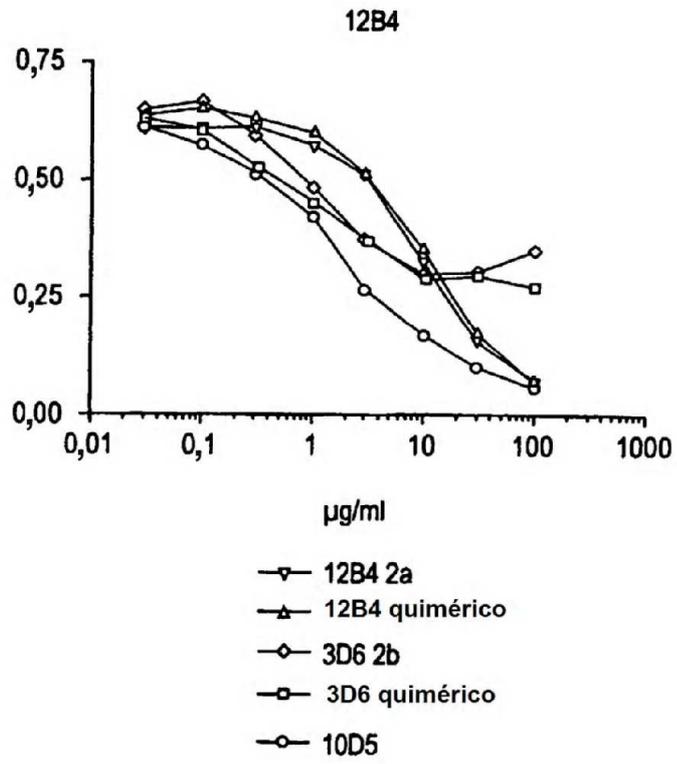


FIG. 7

Ex vivo sobre secciones de cerebro de PDAPP
1-42 ELISA

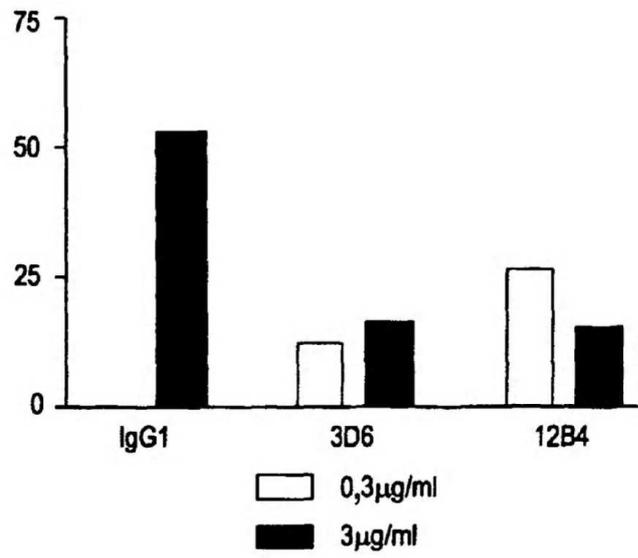


FIG. 8A

Ex vivo sobre secciones de cerebro de EA
(12 años + duración de la enfermedad)

1-42 ELISA

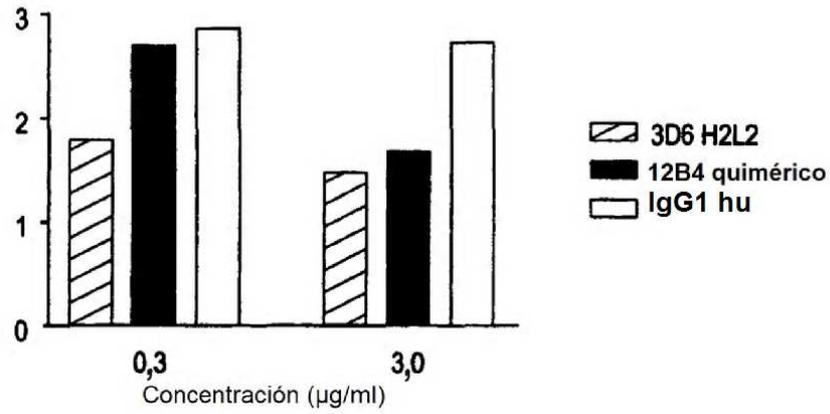


FIG. 8B

Ex vivo sobre secciones de cerebro de EA
(12 años + duración de la enfermedad)

X-42 ELISA

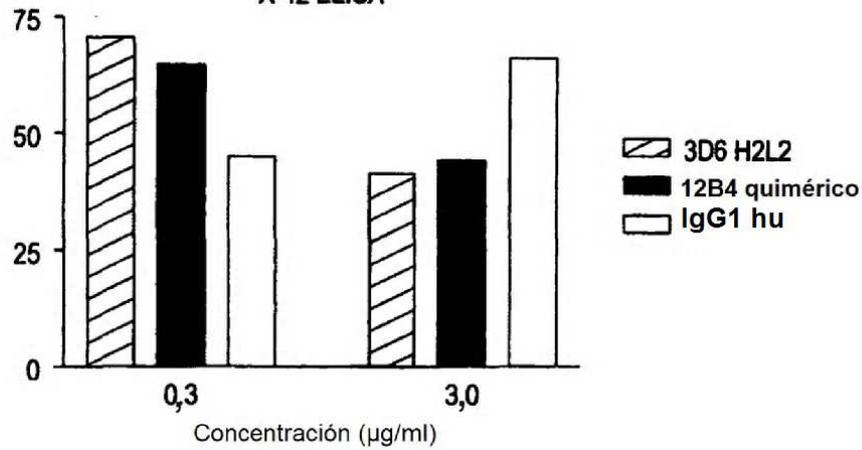


FIG. 9A

Estrategia para el ensamblaje mediado por PCR de VL.v1 humanizado

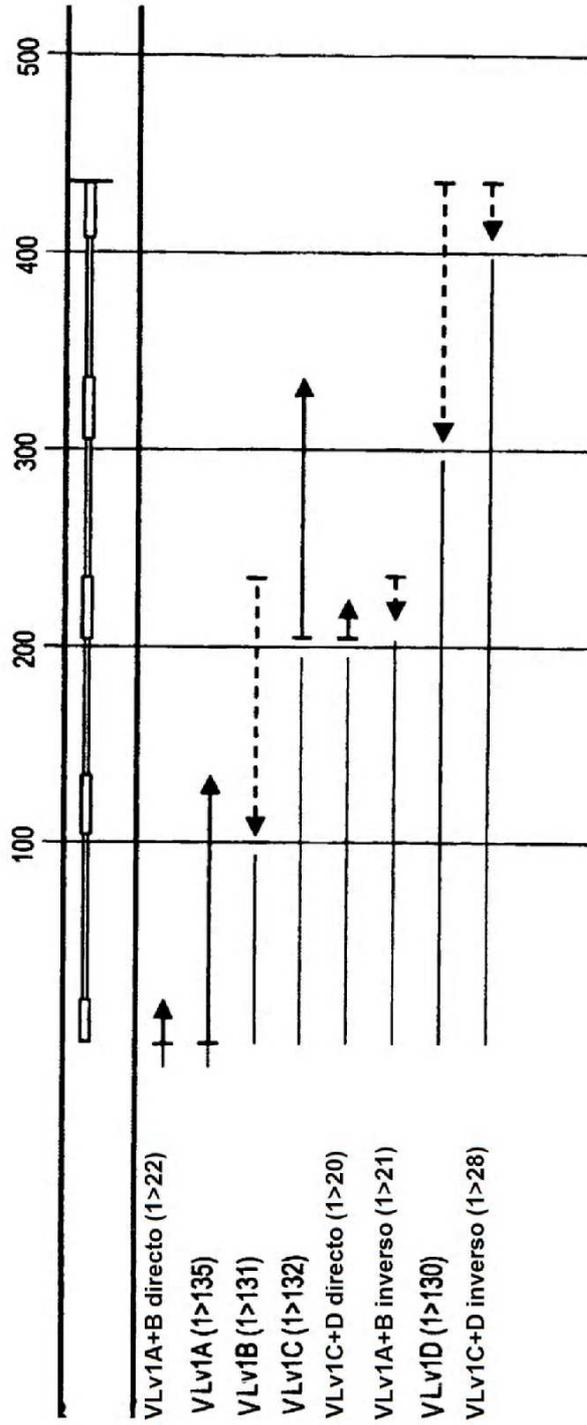


FIG. 9B

Estrategia para el ensamblaje mediado por PCR de VH.v1 humanizado

