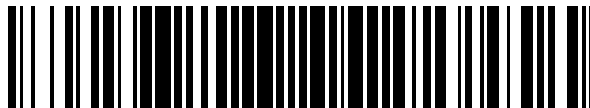


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 905**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07024341 .5**  
96 Fecha de presentación: **16.08.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1944040**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **Método de ensayo para la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:  
17.08.2001 US 313221 P  
23.10.2001 US 334987 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
30.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
30.11.2012

73 Titular/es:  
**WASHINGTON UNIVERSITY (50.0%)**  
**ONE BROOKINGS DRIVE**  
**ST. LOUIS, MO 63110, US y**  
**ELI LILLY AND COMPANY (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**HOLTZMAN, DAVID M.;**  
**DEMATTOS, RONALD;**  
**BALES, KELLY R.;**  
**CUMMINS, DAVID J. y**  
**PAUL, STEVEN M.**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 391 905 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de ensayo para la enfermedad de Alzheimer

Campo Técnico

5 La invención se refiere a un ensayo que permite la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer preclínica y clínica. El test está basado en la evaluación de los niveles del péptido amiloide beta ( $A\beta$ ) en plasma después de la administración de ciertos anticuerpos anti- $A\beta$  a un individuo.

Técnica Anterior

10 Cierta número de patologías que dan como resultado déficits cognitivos, accidente cerebrovascular, hemorragia cerebral, y debilitación mental general parecen estar asociadas con placas neuríticas y cerebrovasculares en el cerebro que contienen el péptido amiloide beta ( $A\beta$ ). Entre estas afecciones se encuentran tanto la enfermedad de Alzheimer preclínica como la clínica, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral preclínica y clínica (CAA). Las placas amiloides están formadas por péptidos de amiloide beta. Estos péptidos circulan en la sangre y en el fluido cerebroespinal (CSF). El péptido  $A\beta$  en forma circulante está compuesto de 39-43 aminoácidos (en la mayoría de los casos 40 ó 42 aminoácidos) resultantes de la escisión de una proteína precursora común, la proteína precursora de amiloide, designada a menudo APP.

15 La evidencia sugiere que  $A\beta$  puede transportarse alternativamente hacia atrás y adelante entre el cerebro y la sangre (Ghersi-Egea, J-F., et al., J. Neurochem. (1996) 67:880-883; Zlokovic, B.V., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67:1034-1040; Shibata, M., et al., J. Clin. Invest. (2000)106:1489-1499. Adicionalmente,  $A\beta$  está en equilibrio en las placas con  $A\beta$  soluble en el cerebro y la sangre (Kawarabayashi, T., et al., J. Neurosci. (2001) 21:372-381), DeMattos et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci USA (2001) 98:8850-8855.

20 Como se describe en la solicitud PCT US00/35681 y U.S. Núm. de Serie 09/153130 incorporadas ambas en esta memoria por referencia, los niveles totales circulantes de péptido  $A\beta$  en CSF son similares en los individuos normales y los individuos predispuestos para exhibir los síntomas del Alzheimer. Sin embargo, los niveles de  $A\beta_{42}$  son más bajos por término medio en los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer (Nitsch, RM., et al., Ann. Neurol. (1995) 37:512-518). Es sabido que  $A\beta_{42}$  es más propenso a agregarse que lo es  $A\beta_{40}$ , y cuando sucede esto, sobrevienen consecuencias adversas tales como la deposición de  $A\beta$  en placas amiloides, conversión de  $A\beta$  en formas tóxicas, deterioro de células nerviosas, y empeoramiento conductual tal como demencia (Golde T.E., et al., Biochem. Biophys. Acta. (2000) 1502:172-187).

30 La solicitud PCR PCT/US01/06191 titulada "Humanized Antibodies That Sequester  $A\beta$  Peptide", presentada el 26 de febrero de 2001 e incorporada en esta memoria por referencia, describe anticuerpos que no atraviesan apreciablemente la barrera hematoencefálica y que secuestran los péptidos  $A\beta$  que circulan en los fluidos biológicos. Estos anticuerpos se describen como útiles para tratamiento preventivo y terapéutico de afecciones asociadas con la formación de placas difusas, neuríticas y cerebrovasculares que contienen  $A\beta$  en el cerebro. La solicitud describe la administración de los anticuerpos seguida por la medición de los niveles circulantes del péptido  $A\beta$  en la sangre a fin de evaluar el progreso de la terapia. No se hace sugerencia clara alguna, sin embargo, de que los niveles de péptido  $A\beta$  después de la administración de los anticuerpos sean diagnósticos de la afección propiamente dicha. La presente invención está basada en el resultado sorprendente de que niveles incrementados tanto de  $A\beta_{40}$  como de  $A\beta_{42}$ , así como la ratio  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  están correlacionados con los niveles de deposición del péptido  $A\beta$  en el cerebro cuando los anticuerpos se han administrado a un individuo. Así pues, la medida de estos componentes en la sangre después de administración del anticuerpo proporciona un test de diagnóstico directo para la enfermedad de Alzheimer tanto clínica como preclínica y trastornos neurológicos afines.

45 Existen publicaciones relevantes adicionales concernientes al comportamiento de los anticuerpos del péptido  $A\beta$ . Por ejemplo, la publicación PCT WO 99/27944 publicada el 10 de junio de 1999 describe métodos para inducir una respuesta inmune a fin de reducir los depósitos amiloides. La publicación No. WO 99/60024 publicada el 25 de noviembre de 1999 describe métodos para eliminación del amiloide utilizando anticuerpos anti-amiloide. Publicaciones PCT adicionales, que incluyen WO 00/72880, WO 00/72876 y WO 00/77178 describen todas ellas diversas actividades de anticuerpos anti-péptido  $A\beta$ . Se dice que los anticuerpos dirigidos al término N de este péptido reducen las placas en un modelo de murino transgénico; se describe la inmunización con el amiloide propiamente dicho, así como anticuerpos diseñados para catalizar la hidrólisis del péptido.

50 Se ha demostrado que un camino para el metabolismo de  $A\beta$  es por transporte desde el CNS al plasma (Zlokovic, B.V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) (1996) 93:4229-4234; Ghersi-Egea, J-F., et al., J. Neurochem. (1996) 67: 880-883). Adicionalmente, se ha demostrado que  $A\beta$  en el plasma puede atravesar la barrera hematoencefálica y entrar en el cerebro (Zlokovic, B. V., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67:1034-1040). Se ha demostrado también que la administración de ciertos anticuerpos  $A\beta$  policlonales y monoclonales reduce la deposición de  $A\beta$  en placas amiloides en el modelo de ratón transgénico APP<sup>V717F</sup> de la enfermedad de Alzheimer (Bard, F., et al., Nature Med. (2000) 6:916-919). Se dijo que esto era debido a que ciertos anticuerpos anti- $A\beta$  atraviesan la barrera hematoencefálica y estimulan la fagocitosis de las placas amiloides por las células microgliales. En los experimentos

de Bard, ensayos de cortes de cerebro *ex vivo* demostraron que la presencia de anticuerpo A $\beta$  añadido, junto con microglía añadida exógenamente, inducía la fagocitosis de A $\beta$ , dando como resultado la eliminación de los depósitos de A $\beta$ .

5 Los niveles de A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$ , ambos solubles, en CSF y sangre pueden ser detectados fácilmente utilizando ensayos estandarizados que utilizan anticuerpos dirigidos contra los epítopes a lo largo de la cadena de A $\beta$ . Tales ensayos han sido consignados, por ejemplo, en las Patentes U.S. 5.766.846; 5.837.672; y 5.593.846. Estas Patentes describen la producción de anticuerpos monoclonales murinos para el dominio central del péptido A $\beta$ , y se consignó que éstos tienen epítopes alrededor de las posiciones 16 y 17, ambas inclusive. Se describían también anticuerpos dirigidos contra la región N-terminal. Se afirmaba que varios anticuerpos monoclonales inmunorreaccionan con las 10 posiciones 13-28 del péptido A $\beta$ ; éstos no se fijaban a un péptido que representa las posiciones 17-28, estableciendo por tanto, de acuerdo con las citadas Patentes, que es esta región, con inclusión de las posiciones 16-17 (el sitio de la secretasa 0) la que constituía la diana de estos anticuerpos. Entre los anticuerpos conocidos que se fijan entre los aminoácidos 13 y 28 de A $\beta$  se encuentran los anticuerpos de ratón 266 (m266), 4G8 y 1C2.

#### Exposición de la Invención

15 Se ha encontrado ahora que anticuerpos que son útiles para realización de ensayos para el péptido A $\beta$ , y que son útiles en el tratamiento de afecciones asociadas con las placas amiloides en el cerebro, pueden provocar una respuesta que da como resultado un aumento acusado en el nivel de péptido A $\beta$  en la sangre, y este nivel puede utilizarse como marcador de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer clínica y preclínica. Estos anticuerpos, que pueden ser o no anticuerpos humanizados, secuestran el péptido A $\beta$  de su forma combinada circulante en la 20 sangre, y alteran el aclaramiento de las formas soluble y combinada de A $\beta$  en el sistema nervioso central y el plasma. Estos anticuerpos, y fragmentos de los mismos, se fijan específicamente a un epítope entre los aminoácidos 13 y 28 de la molécula A $\beta$ . La CDR de estos anticuerpos puede derivarse del anticuerpo monoclonal de ratón 266 (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6). Anticuerpos útiles incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, en donde las regiones variables tienen secuencias que comprenden la CDR del anticuerpo de ratón 266 y secuencias de 25 entramado humanas específicas (SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 10), en donde los anticuerpos retienen aproximadamente las propiedades de fijación del anticuerpo de ratón y tienen propiedades *in vitro* e *in vivo* funcionalmente equivalentes a las del anticuerpo 266 de ratón. Son especialmente útiles anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos, en los cuales la cadena ligera es SEQ ID NO: 11 y la cadena pesada es SEQ ID NO: 12.

30 Así, en un aspecto la invención está dirigida a un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica que comprende:

(a) medir el nivel de A $\beta_{42}$  en una muestra de sangre de un individuo obtenida al cabo de un intervalo de tiempo después de administrar a dicho individuo una cantidad de un anticuerpo que se fija específicamente a un epítope contenido en las posiciones 13-28 de A $\beta$  o un anticuerpo que secuestra el péptido A $\beta$  de su forma combinada circulante en la sangre y altera el aclaramiento de las formas soluble y combinada de A $\beta$  en el 35 sistema nervioso central en plasma, en donde dicha cantidad es eficaz para alterar los niveles de péptidos A $\beta$  circulantes en la sangre de dicho individuo cuando dicho individuo se encuentra en una fase preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer; y

(b) comparar el nivel de A $\beta_{42}$  en dicho individuo con un valor de control de dichos niveles, en donde los niveles elevados de A $\beta_{42}$  en dicho individuo comparados con niveles de control identifican que dicho individuo se encuentra en una etapa preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer;

en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende:

(i) una cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) siguientes: CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1; CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2; y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia 45 de aminoácidos SEQ ID NO. 3; y

(ii) una cadena pesada que comprende las CDRs siguientes: CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 4; CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 5; y CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.6.

#### Breve Descripción de los Dibujos

50 Las Figuras 1A, B y C son gráficos que muestran los niveles de A $\beta_{40}$  (Figura 1A), A $\beta_{42}$  (Figura 1B), y ratio A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  (Figura 1C) en plasma de ratones transgénicos antes de la administración del anticuerpo m266, y la falta de correlación con los depósitos cerebrales de A $\beta$ .

Las Figuras 2A y B son gráficos que muestran A $\beta_{40}$  en plasma (Figura 2A) y la ratio A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  en plasma (Figura 2B) en ratones transgénicos 1 hora después de la inyección del anticuerpo m266, y la correlación significativa con los depósitos cerebrales de A $\beta$ .

Las Figuras 3A, B y C son gráficos que muestran las correlaciones significativas de los dos péptidos A $\beta$  (Figuras 3A y 3B) y su ratio (Figura 3C) con la deposición de péptidos A $\beta$  en el cerebro 24 horas después de inyección con el anticuerpo monoclonal m266.

5 Las Figuras 4A, B y C son gráficos que muestran las correlaciones significativas de las velocidades de entrada en la circulación de los dos péptidos A $\beta$  (Figuras 4A y 4B) y su ratio (Figura 4C) y la deposición de péptido A $\beta$  en ratones transgénicos.

Las Figuras 5A y B son gráficos que muestran una representación gráfica alternativa de los niveles de A $\beta_{40}$  en el plasma 24 horas (Figura 5A) y 1 hora (Figura 5B) después de inyección de m266 correlacionados con el porcentaje del hipocampo cubierto por depósitos A $\beta$ .

10 La Figura 6 es una tabla que muestra los coeficientes de correlación de Pearson (Pearson r) y la significación (valor P) determinados entre los valores de A $\beta$  en plasma (antes y después de inyección de m266) y la carga de A $\beta$  o amiloide en el hipocampo.

#### Modos de Realización de la Invención

15 Los péptidos A $\beta$  que circulan en los fluidos biológicos humanos representan una región del terminal carboxi de una proteína precursora codificada en el cromosoma 21. Se ha informado, partiendo de los resultados de experimentos *in vitro*, que el péptido A $\beta$  tiene solubilidad deficiente en soluciones fisiológicas, dado que contiene un tramo de aminoácidos hidrófobos que forman parte de la región que ancla su precursor más largo a las membranas lipídicas de las células. Por tanto, no es sorprendente que el péptido A $\beta$  circulantes esté complejado normalmente con otros restos que impiden que el mismo se aglomere. Esto da como resultado dificultades en la detección del péptido A $\beta$  circulante en los fluidos biológicos.

20 Los documentos de Patente arriba mencionados (Patentes U.S. 5.766.846; 5.837.672 y 5.593.846) describen la preparación de anticuerpos, con inclusión de un anticuerpo monoclonal, designado clon 266 (m266), que fue generado contra un péptido que comprende los aminoácidos 13-28 del péptido A $\beta$ , y que se ha demostrado se fija específicamente al mismo. Los solicitantes han encontrado que después de la administración de m266 a ratones APP<sup>V717F</sup>, un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer, aquéllos pueden medir niveles de péptidos A $\beta$  en la circulación que son diagnósticos de los niveles de placas amiloides en el cerebro. Así pues, estos anticuerpos son útiles no sólo en la realización de ensayos para péptidos A $\beta$  circulantes *per se*, sino también para provocar niveles circulantes en sangre que son diagnósticos de la cantidad de placa amiloide en el cerebro, y son útiles por tanto en la identificación de individuos en las fases clínica y preclínica de la enfermedad de Alzheimer. Uno de tales anticuerpos, m266, se fija a la región media del péptido A $\beta$ .

30 Por "anticuerpo monoclonal que se fija a la región media del péptido A $\beta$ " se entiende un anticuerpo monoclonal (Mab o Mabs) que se fija a una secuencia de aminoácidos que representa un epítopo contenido entre las posiciones 13 y 28 de A $\beta$ . No es preciso que esté direccionado a la región entera. Siempre que el anticuerpo se fije al menos a un epítopo dentro de esta región (especialmente, *v.g.*, que incluya el sitio 16-17 de  $\alpha$ -secretasa o el sitio al que se fija el anticuerpo 266), tales anticuerpos son eficaces en el método de la invención.

35 Por "anticuerpo" se entiende un anticuerpo monoclonal *per se*, o un fragmento inmunológicamente eficaz del mismo, tal como un fragmento F<sub>ab</sub>, F<sub>ab'</sub>, o F<sub>(ab)2</sub>. En algunos contextos, en esta memoria, se mencionarán fragmentos específicamente por énfasis; no obstante, se entenderá que, con indiferencia de que se especifiquen o no fragmentos, el término "anticuerpo" incluye tales fragmentos así como formas monocatenarias. Siempre que la proteína retenga la capacidad específica para fijarse a su diana propuesta, y en este caso, para secuestrar el péptido A $\beta$  de sus proteínas portadoras en la sangre, la misma se incluye dentro del término "anticuerpo". Se incluyen también dentro de la definición de "anticuerpo" por ejemplo, formas monocatenarias, designadas generalmente regiones F<sub>v</sub>, de anticuerpos con esta especificidad. Preferiblemente, pero no de manera necesaria, los anticuerpos útiles en la invención se producen recombinantemente, dado que se requiere la manipulación de los anticuerpos típicamente murinos u otros anticuerpos no humanos con la especificidad apropiada a fin de convertirlos en forma humanizada. Los anticuerpos pueden estar glicosilados o no, aunque se prefieren anticuerpos glicosilados. Los anticuerpos están reticulados adecuadamente por enlaces disulfuro, como es bien sabido.

40 Es sabido que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos fundamentalmente responsables del reconocimiento de antígeno. La porción del terminal carboxilo de cada cadena define una región constante fundamentalmente responsable de la función efectora.

45 Las cadenas ligeras se clasifican como gamma, mu, alfa, y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de

aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más.

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de fijación del anticuerpo. Así, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de fijación. Las cadenas exhiben todas ellas la misma estructura general de regiones de entramado (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, denominadas también regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones de entramado, permitiendo la fijación a un epítoto específico. Desde el terminal N al terminal C, ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con convenciones bien conocidas [Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991; Chothia, et al., J. Mol. Bio. (1987)196:901-917; Chothia, et al., Nature (1989) 342:878-883].

Como es bien conocido en la técnica, pueden generarse fácilmente anticuerpos monoclonales con especificidad apropiada por técnicas estándar de inmunización de mamíferos, formando hibridomas a partir de las células productoras de anticuerpos de dichos mamíferos o inmortalizando las mismas de otro modo, y cultivando los hibridomas o las células inmortalizadas para su evaluación en cuanto a la especificidad apropiada. En el caso presente, tales anticuerpos podrían generarse por inmunización de un humano, conejo, rata o ratón, por ejemplo, con un péptido que represente un epítoto que abarque la región 13-28 del péptido A $\beta$  o una subregión apropiada del mismo. Los materiales para manipulación recombinante pueden obtenerse por recuperación de las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo deseado a partir del hibridoma u otra célula que produzca el mismo. Estas secuencias de nucleótidos pueden manipularse luego para proporcionarlas en forma humanizada, si se desea.

Puede ser deseable utilizar formas humanizadas de estos anticuerpos a fin de provocar los niveles circulantes deseados de los péptidos en individuos humanos. Dado que la administración es de corta duración y únicamente para propósitos de diagnóstico, esto puede no ser necesario; sin embargo, es claramente preferible a fin de evitar cualquier posibilidad de una respuesta inmune, por lo que se prefiere el uso de formas humanizadas para este propósito. Por supuesto, para la realización del ensayo de niveles de A $\beta$  *ex vivo* (v.g. por ELISA), pueden utilizarse las formas murinas apropiadamente dichas.

Por "anticuerpo humanizado" se entiende un anticuerpo que está compuesto parcial o totalmente de secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de anticuerpos humana por alteración de la secuencia de un anticuerpo que tenga regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas. La más simple de tales alteraciones puede estar constituida simplemente por sustitución de la región constante de un anticuerpo humano en lugar de la región constante murina, dando así como resultado una quimera humana/murina que puede tener inmunogenicidad suficientemente baja para ser aceptable para uso farmacéutico. Preferiblemente, sin embargo, la región variable del anticuerpo e incluso la CDR se humaniza también por métodos que son ahora bien conocidos en la técnica. Las regiones de entramado de las regiones variables se sustituyen por las regiones de entramado humanas correspondientes, dejando la CDR no humana sustancialmente intacta, o incluso reemplazando la CDR con secuencias derivadas de un genoma humano. Se producen anticuerpos totalmente humanos en ratones modificados genéticamente cuyos sistemas inmunes han sido alterados para corresponderse con los sistemas inmunes humanos. Como se ha mencionado arriba, es suficiente para uso en los métodos de la invención emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, con inclusión de fragmentos que representen formas monocatenarias.

Un anticuerpo humanizado se refiere así a un anticuerpo que comprende un entramado humano, al menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en el cual cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, con preferencia al menos 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDRs, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativas. Por ejemplo, una inmunoglobulina inmunizada no abarcaría típicamente un anticuerpo quimérico región variable de ratón/región constante humana.

El diseño de inmunoglobulinas humanizadas puede realizarse como sigue. Cuando un aminoácido cae dentro de la categoría siguiente, el aminoácido de entramado de una inmunoglobulina humana a utilizar (inmunoglobulina aceptora) se reemplaza por un aminoácido de entramado de una inmunoglobulina no humana que proporcione una CDR (inmunoglobulina donante): (a) el aminoácido en la región de entramado humana de la inmunoglobulina aceptora es inusual para la inmunoglobulina humana en dicha posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es típico para la inmunoglobulina humana en dicha posición; (b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDRs; o (c) cualquier átomo de la cadena lateral de un aminoácido de entramado está dentro de aproximadamente 5-6 Angstroms (centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de CDR en un modelo tridimensional de inmunoglobulina [Queen, *et al.*, *Op. Cit.*, and Co, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2869]. Cuando cada uno de los aminoácidos en la región de entramado humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es inusual para la inmunoglobulina humana en dicha posición, dicho aminoácido se reemplaza por un aminoácido típico para inmunoglobulina humana en dicha posición.



ES 2 391 905 T3

```

1           5           10           15
Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa
           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa
           35           40           45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro
           50           55           60
Gly Gln Ser Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val
           95           100          105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa
           110
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:7)

```

en donde:

- 5 Xaa en la posición 2 es Val o Ile;
- Xaa en la posición 7 es Ser o Thr;
- Xaa en la posición 14 es Thr o Ser;
- Xaa en la posición 15 es Leu o Pro;
- Xaa en la posición 30 es Ile o Val;
- Xaa en la posición 50 es Arg, Gln, o Lys;
- 10 Xaa en la posición 88 es Val o Leu;
- Xaa en la posición 105 es Gln o Gly;
- Xaa en la posición 108 es Lys o Arg; y
- Xaa en la posición 109 es Val o Leu.

15 Una región variable de cadena pesada preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el entramado se ha originado a partir de los segmentos VH DP53 de la línea germinal humana y el segmento J JH4, con varias sustituciones de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de consenso en el mismo subgrupo humano a fin de reducir inmunogenicidad potencial:

```

1           5           10           15
Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
           20           25           30
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
           35           40           45
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
           50           55           60
Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr
           65           70           75
Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa
           80           85           90
Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp
           95           100          105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
           110
Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:8)

```

ES 2 391 905 T3

en donde:

- Xaa en la posición 1 es Glu o Gln;
- Xaa en la posición 7 es Ser o Leu;
- Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp, o Ser;
- Xaa en la posición 63 es Thr o Ser;
- Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val, o Thr;
- Xaa en la posición 76 es Lys o Arg;
- Xaa en la posición 89 es Glu o Asp; y
- Xaa en la posición 107 es Leu o Thr.

- 5
- 10 Una región variable de cadena ligera particularmente preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el entramado se ha originado a partir de segmentos Vk DPK18 de la línea germinal humana y el segmento J Jk1, con varias sustituciones de aminoácidos respecto a los aminoácidos de consenso en el mismo subgrupo humano V a fin de reducir inmunogenicidad potencial:

```

1           5           10           15
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu

           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile

           35           40           45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro

           50           55           60
Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

           95           100          105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

           110
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:9).

```

- 15 Una región variable de cadena pesada particularmente preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el entramado se ha originado a partir de segmentos VH DP53 de la línea germinal humana y el segmento J JH4:



ES 2 391 905 T3

```

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

Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
           80           85           90
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
           95           100          105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
           110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:10).

```

Una cadena ligera preferida para un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos siguiente:

ES 2 391 905 T3

```

1           5           10           15
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu

           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile

           35           40           45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro

           50           55           60
Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

           95           100           105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

           110           115           120
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val

           125           130           135
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala

           140           145           150
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

           155           160           165
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

           170           175           180
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

           185           190           195
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

           200           205           210

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

           215
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO:11).

```

Una cadena pesada preferida para un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos siguiente:

5

10

ES 2 391 905 T3

1		5		10		15								
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
		20		25		30								
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
		35		40		45								
Arg	Tyr	Ser	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
		50		55		60								
Glu	Leu	Val	Ala	Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr
		65		70		75								
Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
		80		85		90								
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
		95		100		105								
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
		110		115		120								
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
		125		130		135								
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
		140		145		150								
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
		155		160		165								
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
		170		175		180								
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
		185		190		195								
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
		200		205		210								
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
		215		220		225								
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro

ES 2 391 905 T3

```

                230                      235                      240
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                      250                      255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
                260                      265                      270
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
                275                      280                      285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
                290                      295                      300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
                305                      310                      315
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
                320                      325                      330
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                335                      340                      345
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                350                      355                      360
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
                365                      370                      375
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
                380                      385                      390
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                395                      400                      405
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                410                      415                      420
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                425                      430                      435
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                440
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:12).

```

5 Son posibles otras secuencias para las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos humanizados y para 266 humanizado. Las inmunoglobulinas pueden tener dos pares de complejos cadena ligera/cadena pesada, comprendiendo al menos una cadena una o más regiones determinantes de la complementariedad de ratón, unidas funcionalmente a segmentos de región de entramado humana.

10 Comenzando en la posición 56 de la región variable de cadena pesada, tanto m266 como 266 humanizado contienen la secuencia Asn-Ser-Thr. Esta secuencia es un ejemplo de la señal Asn-X-Ser/Thr para glicosilación unida a N, en donde Asn es el sitio de fijación de las cadenas glicosilo enlazadas a N. Tanto m266 como 266 humanizado están extensamente glicosilados en este sitio. De modo totalmente impredecible y ventajoso, la afinidad de 266 humanizado que está desglicosilado en la CDR2 de la cadena pesada para el péptido Aβ es notablemente mayor que la de 266 humanizado. La CDR2 de la cadena pesada de 266 desglicosilado humanizado tiene las secuencias de aminoácidos siguientes:

CDR2 de cadena pesada:

```

          1                      5                      10                      15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
(SEQ ID NO:13)

```

15 en donde:

## ES 2 391 905 T3

Xaa en la posición 7 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 8 no es Asp ni Pro y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 7 no es Asn;

Xaa en la posición 8 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 8 es Asp o Pro; y

5 Xaa en la posición 9 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 8 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 9 no es Ser ni Thr;

Por "cualquier aminoácido" se entiende cualquier aminoácido existente naturalmente. Aminoácidos existentes naturalmente preferidos son Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, y Tyr.

10 Un anticuerpo humanizado desglicosilado preferido es una forma humanizada de m266, en la cual la CDR2 de la cadena pesada desglicosilada es SEQ ID NO: 13, en donde:

Xaa en la posición 7 de SEQ ID NO: 13 se selecciona del grupo constituido por Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, y Tyr, con la condición de que si Xaa en la posición 8 no es Asp ni Pro y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 7 no es Asn;

15 Xaa en la posición 8 de SEQ ID NO:13 se selecciona del grupo constituido por Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, y Tyr, con la condición de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 8 es Asp o Pro; y

20 Xaa en la posición 9 de SEQ ID NO:13 se selecciona del grupo constituido por Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, y Tyr, con la condición de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 8 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 9 no es Ser ni Thr.

Una región variable de cadena pesada preferida de un anticuerpo humanizado desglicosilado tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el entramado se ha originado a partir del segmento VH DP53 de la línea germinal humana y el segmento J JH4, con varias sustituciones de aminoácidos respecto a los aminoácidos de consenso en el mismo subgrupo humano a fin de reducir la inmunogenicidad potencial y en donde el sitio de N-glicosilación en la CDR2 de la cadena pesada se ha modificado de tal modo que el mismo no puede glicosilarse en N:

25

```

      1           5           10           15
Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
      20           25           30
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
      35           40           45
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      50           55           60
Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr
      65           70           75
Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa
      80           85           90
Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp
      95           100          105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      110
Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:14)
    
```

en donde:

Xaa en la posición 1 es Glu o Gln;

Xaa en la posición 7 es Ser o Leu;

30 Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp, o Ser;

Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn;

Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro; y

35 Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es Ser ni Thr

Xaa en la posición 63 es Thr o Ser;

Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val, o Thr;

Xaa en la posición 76 es Lys o Arg;

# ES 2 391 905 T3

Xaa en la posición 89 es Glu o Asp; y  
 Xaa en la posición 107 es Leu o Thr.

5 Una región variable de cadena pesada particularmente preferida de un anticuerpo humanizado desglicosilado tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el entramado se ha originado a partir del segmento VH DP53 de la línea germinal humana y el segmento J JH4 y en donde el sitio de glicosilación en N en la CDR2 de la cadena pesada está modificado de modo que el mismo no puede glicosilarse en N:

```

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

  Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
    95           100           105
  Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
    110
  Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
  (SEQ ID NO:15).
  
```

10 en donde:

Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn;  
 Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro; y  
 15 Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es Ser ni Thr.

Una cadena pesada preferida para un anticuerpo humanizado desglicosilado en el cual el sitio de N-glicosilación en la CDR2 de la cadena pesada está modificado de tal modo que el mismo no puede glicosilarse en N, tiene la secuencia de aminoácidos:

20

ES 2 391 905 T3

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

ES 2 391 905 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 140 145 150  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 155 160 165  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 170 175 180  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 185 190 195  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 200 205 210  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 215 220 225  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 230 235 240  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 245 250 255  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 260 265 270  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 275 280 285  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 290 295 300  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 305 310 315  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 320 325 330  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 335 340 345  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 350 355 360  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 365 370 375  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 380 385 390  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 395 400 405  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 410 415 420  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys



```

                425                430                435
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                140
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                (SEQ ID NO:16)
    
```

5 en donde:

Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn;

Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro; y

10 Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es Ser ni Thr.

Anticuerpos 266 desglucosilados preferidos que tienen la región variable pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16 son aquéllos en los cuales:

15 Xaa en la posición 56 se selecciona del grupo constituido por Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, y Thr, con la condición de que si Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn;

Xaa en la posición 57 se selecciona del grupo constituido por Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, y Thr; y

Xaa en la posición 58 se selecciona del grupo constituido por Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, y Thr, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn, entonces Xaa en la posición 58 no es Ser ni Thr.

20 Secuencias preferidas para CDR2 (posiciones 56, 57, y 58) de la cadena pesada SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16 incluyen aquéllas en las cuales se ha cambiado únicamente un aminoácido, aquéllas en las cuales se han cambiado solamente dos aminoácidos, o se han cambiado los tres aminoácidos. Se prefiere reemplazar Asn en la posición 56. Se prefiere reemplazar Thr en la posición 58 con un aminoácido distinto de Ser. Se prefiere no destruir el sitio de N-glicosilación en la CDR2 de la cadena pesada 266 por reemplazamiento de Ser en la posición 57 con Pro o Asp. Se prefieren sustituciones conservadoras en una, dos o las tres posiciones. Las especies más

25 preferidas son aquéllas en las cuales Asn en la posición 56 está reemplazado con Ser o Thr. Anticuerpos particularmente preferidos son aquéllos en los cuales Ser o Thr se encuentra en la posición 56, Ser se encuentra en la posición 57, y Thr se encuentra en la posición 58 de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16.

30 Especies desglucosiladas especialmente preferidas son anticuerpos que comprenden una cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada de SEQ ID NO: 16, en donde en SEQ ID NO: 16, Xaa en la posición 56 es Ser, Xaa en la posición 57 es Ser, y Xaa en la posición 58 es Thr ("N56S"), o en donde en SEQ ID NO: 16, Xaa en la posición 56 es Thr, Xaa en la posición 57 es Ser, y Xaa en la posición 58 es Thr ("N56T").

La producción de los anticuerpos útiles en la invención implica típicamente técnicas recombinantes, como se describen en PCT/US01/06191 citada anteriormente e incorporada en esta memoria por referencia.

35 Los anticuerpos (con inclusión de fragmentos inmunológicamente reactivos) se administran a un individuo que va a ser evaluado respecto a afecciones asociadas con depósitos de A $\beta$  tales como enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica, o angiopatía amiloide clínica o preclínica, utilizando técnicas de administración estándar, preferiblemente de modo periférico (es decir, que no se administran al sistema nervioso central) por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o en forma de supositorios.

40 Las composiciones para administración se diseñan de manera que sean apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se utilizan, según sea apropiado, excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, agentes tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizadores y análogos. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, última edición, proporciona un compendio de técnicas de formulación que son generalmente conocidas por los

45 especialistas. Puede ser particularmente útil alterar las características de solubilidad de los anticuerpos, haciéndolos más lipófilos, por ejemplo, por encapsulación de los mismos en liposomas o por bloqueo de grupos polares.

Se prefiere el suministro sistémico periférico por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Vehículos adecuados para tales inyecciones son sencillos. Adicionalmente, sin embargo, la administración puede efectuarse también a través de las membranas mucosas por medio de aerosoles nasales o supositorios. Formulaciones

50 adecuadas para tales modos de administración son bien conocidas e incluyen típicamente agentes tensioactivos que facilitan la transferencia a través de las membranas. Tales agentes tensioactivos se derivan a menudo de esteroides

o son lípidos catiónicos, tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o diversos compuestos tales como hemisuccinato de colesterol, fosfatidil-glicerol y análogos.

La concentración del anticuerpo humanizado en las formulaciones puede ser desde tan baja como aproximadamente 0,1% hasta tan alta como 15 ó 20% en peso, y se seleccionará fundamentalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, etcétera, de acuerdo con el modo de administración particularmente seleccionado. Así, una composición típica para inyección podría estar formada de modo que contuviera 1 ml de agua tamponada estéril de solución salina tamponada con fosfato y 1-1000 mg, preferiblemente 10-100 mg, del anticuerpo humanizado. La formulación podría filtrarse en condiciones estériles después de la preparación de la formulación, o hacerse de algún otro modo microbiológicamente aceptable. Una composición típica para infusión intravenosa podría tener volúmenes comprendidos entre 1 y 250 ml de fluido, tal como solución estéril de Ringer, y 1-100 mg por ml o más en concentración de anticuerpo. Los agentes terapéuticos pueden congelarse o liofilizarse para almacenamiento y reconstituirse en un vehículo estéril adecuado antes de su utilización. La liofilización y reconstitución puede conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo (v.g. con las inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a exhibir mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG). Las dosificaciones pueden tener que ajustarse para compensar. El pH de la formulación se seleccionará a fin de equilibrar la estabilidad (química y física) del anticuerpo y la comodidad para el paciente durante la administración. Generalmente, se tolera un pH comprendido entre 4 y 8.

Aunque los métodos anteriores parecen ser los más convenientes y más apropiados para administración de proteínas tales como anticuerpos humanizados, por adaptación adecuada, pueden emplearse otras técnicas de administración, tales como administración transdérmica y administración oral con tal que se diseñe una formulación apropiada.

Adicionalmente, puede ser deseable emplear formulaciones de liberación controlada que utilicen films y matrices biodegradables, o minibombas osmóticas, o sistemas de suministro basados en perlas de dextrano, alginato, o colágeno.

En suma, están disponibles formulaciones para administración de los anticuerpos y son bien conocidas en la técnica, pudiendo seleccionarse de una diversidad de opciones.

Los niveles típicos de dosificación pueden optimizarse utilizando técnicas clínicas estándar y dependerán del modo de administración.

Después de la administración del anticuerpo al individuo, se extraen muestras de sangre a intervalos periódicos durante los minutos, horas o días subsiguientes. Los periodos de tiempo adecuados pueden ser tan cortos como unos cuantos minutos, 10 minutos, 30 minutos, o 1 hora, varias horas, o pueden dejarse transcurrir días antes de la extracción de la muestra de sangre. Se prefiere la medida después menos de 3 horas. Si se desea, puede obtenerse la fracción de plasma para facilidad de análisis. Se utilizan técnicas analíticas estándar para análisis del  $A\beta_{40}$ , el  $A\beta_{42}$  y la ratio de los mismos. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. 5.766.846. Sin embargo, puede emplearse cualquier técnica de análisis adecuada, tal como separación cromatográfica, transferencia Western, ensayos ELISA, ensayos homogéneos y análogos.

La concentración del  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , o su ratio se compara luego con estos valores en un control. Los controles típicos incluyen individuos que se sabe están exentos de afecciones asociadas con las placas amiloides, tales como personas adolescentes o adultos muy jóvenes y, adicionalmente, se obtienen controles cognitivamente normales de edad similar promediando los valores de la población general. Si bien algunos controles ancianos cognitivamente normales de edad coincidente tienen AD preclínica, la mayoría no lo hacen. Por tanto, los valores medios para una población de este tipo serán útiles y de obtención crítica. El diseño de controles estará es un proceso bien conocido por el especialista ordinario. Los individuos que tienen niveles elevados de los péptidos indicados o de la ratio de  $A\beta_{40}$  a  $A\beta_{42}$  en comparación con los valores de control se identifican luego como personas que presentan una gran probabilidad de afecciones clínicas o preclínicas asociadas con la formación de placas amiloides.

Puede ser deseable empaquetar los componentes para realización del ensayo de la invención en kits convenientes. Tales kits incluirán recipientes tales como frascos o viales que contienen muestras del anticuerpo a administrar así como los reactivos apropiados para realización del ensayo sobre la muestra de sangre extraída. El kit contendrá también instrucciones para la realización del ensayo y, opcionalmente, gráficos de valores de control. Sin embargo, tales kits no forman parte de la invención reivindicada.

Los ejemplos siguientes tienen por objeto ilustrar la invención, pero sin limitar la misma.

Los ejemplos que se ofrecen a continuación emplean, entre otros, un anticuerpo monoclonal murino designado "266" que se preparó originalmente por inmunización con un péptido constituido por los residuos 13-28 del péptido  $A\beta$  humano. Se confirmó que el anticuerpo inmunorreaccionaba con este péptido, pero se había confirmado previamente que no reaccionaba con el péptido que contenía únicamente los residuos 17-28 del péptido  $A\beta$  humano, o con ningún otro epítipo encontrado en el péptido  $A\beta$ . La preparación de este anticuerpo se describe en la Patente U.S. 5.766.846. Dado que los ejemplos de esta memoria describen experimentos realizados en sistemas murinos, el

uso de anticuerpos monoclonales murinos es satisfactorio. Sin embargo, se prefieren formas humanizadas de los anticuerpos con la inmunoespecificidad correspondiente a la del anticuerpo 266.

### EJEMPLO 1

#### Correlación de Niveles de Péptido Circulante con las Placas

5 En este ensayo se utilizó un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer, ratones transgénicos APP V717F. Estos ratones han sido descritos por Games, D., et al., Nature (1995) 373:523-527; Bales, K.R., et al., Nature Genet. (1997) 17:263-264; y por Holtzman, D.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2000) 97:2892-2897. En este modelo, se expresa una forma mutante del gen humano APP y da como resultado una forma de aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer familiar. Aunque los cerebros de estos ratones parecen normales inicialmente, la deposición de A $\beta$  en la forma de placas difusas y neuríticas ocurre a los 6-15 meses, aunque ratones homocigóticos para el transgén exhiben variabilidad en el sentido de que a los 9-14 meses de edad, algunos ratones presentan depósitos A $\beta$  mientras que otros no lo hacen.

En este estudio se utilizaron 53 ratones homocigóticos de 12 meses.

15 Los niveles en plasma de A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$  y las ratios A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  se midieron por ELISA en el plasma de estos ratones antes de la administración de 500  $\mu$ g de m266 y en diversos intervalos de tiempo hasta 24 horas después de la administración de este anticuerpo. Después de 24 horas, se sacrificaron los ratones, y se estimó en el hipocampo y el córtex la cantidad de deposición de A $\beta$  en el cerebro como ha sido descrito por DeMattos, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) 98:8850-8855, evaluándose como porcentaje del cerebro cubierto por depósitos de A $\beta$ .

20 Como se muestra en las Figuras 1A, B y C, si el porcentaje de cobertura de A $\beta$  debido a deposición en el hipocampo se representa gráficamente en el eje x contra los niveles de los péptidos y su ratio en plasma en el eje y antes de la administración del anticuerpo, no se encuentra correlación alguna. Con indiferencia de si el porcentaje de deposición de A $\beta$  era esencialmente cero (0) o mayor que 75%, el nivel medio de A $\beta_{40}$  era aproximadamente 250 (pg/ml) y el de A $\beta_{42}$  aproximadamente 400 pg/ml). La ratio de A $\beta_{40}$  a A $\beta_{42}$  era por tanto aproximadamente 0,5-0,6.

25 En cambio, como se muestra en las Figuras 2A y B, el nivel en plasma de A $\beta_{40}$  estaba fuertemente correlacionado con el porcentaje de deposición de A $\beta$  en el hipocampo una hora después de la inyección de m266, al igual que lo hacía la ratio de A $\beta_{40}$  a A $\beta_{42}$ .

30 Las Figuras 3A, B y C muestran resultados similares obtenidos 24 horas después de la inyección. Los niveles obtenidos de A $\beta_{40}$  y la ratio A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  estaban fuertemente correlacionados con el porcentaje de deposición de A $\beta$  en el hipocampo. Los niveles de A $\beta_{42}$  estaban correlacionados también con el % de deposición de A $\beta$  pero no tanto como los niveles de A $\beta_{40}$ .

Las Figuras 4A, B y C muestran resultados análogos con respecto a la velocidad de entrada de los dos péptidos A $\beta$  en el plasma y los valores calculados para la velocidad de entrada en función de la ratio de estos péptidos. Las mejores correlaciones con la deposición de A $\beta$  eran la velocidad de entrada de A $\beta_{40}$  y la ratio de A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$ .

35 Las Figuras 5A y B exhiben una presentación alternativa de los datos para los niveles en plasma de A $\beta_{40}$  24 horas y 1 hora después de la inyección de m266. Cuando los ratones se agruparon de acuerdo con la cobertura de AB baja, media o alta en el hipocampo, los animales con baja deposición de A $\beta$  podían distinguirse completamente de aquéllos que tenían deposición alta en función del nivel de A $\beta_{40}$  en plasma.

### Ejemplo 2

40 En un estudio similar al expuesto en el Ejemplo 1, se utilizó un grupo de 49 ratones APP V717F homocigóticos. Antes y después de la inyección de 500  $\mu$ g IV de m266, se obtuvieron muestras de plasma al cabo de 5 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas, y se estimaron los niveles de A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$  como se describe en el Ejemplo 1. Los ratones se sacrificaron después de 24 horas y se estimó un hemisferio respecto al porcentaje del área del hipocampo o el córtex cingulado ocupado por péptido A $\beta$  (utilizando tinción por inmunofluorescencia cuantitativa de A $\beta$ ) y el área ocupada por el amiloide (por tinción con tioflavina-S (amiloide)). Las regiones del otro hemisferio se estimaron respecto a péptido A $\beta$  por ELISA.

45 Se determinaron el coeficiente de clonación de Pearson (Pearson r) y la significación (valor P) entre los valores de A $\beta$  en plasma (antes y después de la inyección de m266) y la carga de A $\beta$  o amiloide en el hipocampo utilizando el software GraphPad Prism (versión 3.00 para Windows, San Diego, USA). La carga de A $\beta$  se define como el área porcentual del hipocampo cubierta por depósitos de A $\beta$  inmunorreactivos. La carga de amiloide se define como el área porcentual del hipocampo cubierta por depósitos positivos de tioflavina-S. Se determinaron también correlaciones entre la acumulación de A $\beta$  en plasma a lo largo de 24 horas (área bajo la curva, AUC) y la carga de A $\beta$  o carga de amiloide en el hipocampo.

La Figura 6 muestra los resultados obtenidos. Resumidamente, se encontró que los niveles de la línea base (antes de la inyección) de A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$  y la ratio A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  calculada antes de la inyección con m266 no guardaban

correlación con el porcentaje de A $\beta$  o deposición de amiloide. En cambio, después de la administración de m266, existían correlaciones significativas entre A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$ , y la ratio A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  en plasma tanto con A $\beta$  como con la carga de amiloide en el hipocampo y el córtex cingulado.

5 El análisis estadístico de los resultados permite una predicción exacta de la carga de A $\beta$  en el hipocampo en estos ratones basándose en los niveles de A $\beta_{40}$  en plasma 24 horas después de la inyección de m266.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ELI LILLY AND COMPANY and WASHINGTON UNIVERSITY

<120> MÉTODO DE ENSAYO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

<130> 8792/292

<150> 60/334,987

<151> 2001-10-23

ES 2 391 905 T3

<150> 60/313,221  
<151> 2001-08-17

<150> 60/313,224  
<151> 2001-08-17

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (1)..(16)  
<223>CDR1 DE CADENA LIGERA

<400> 1

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 2  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<223>CDR2 DE CADENA LIGERA

<400> 2

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (1)..(9)  
<223> CDR3 DE CADENA LIGERA

<400> 3

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr  
1 5

ES 2 391 905 T3

<210> 4  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (1)..(5)  
<223> CDR1 DE CADENA PESADA

<400> 4

Arg Tyr Ser Met Ser  
1 5

<210> 5  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (1)..(17)  
<223> CDR2 DE CADENA PESADA

<400> 5

Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 6  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (1)..(3)  
<223> CDR3 DE CADENA PESADA

<400> 6

Gly Asp Tyr  
1

<210> 7  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Anticuerpo humanizado

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (1) .. (113)  
<223>REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE ANTICUERPO HUMANIZADO

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA  
<222> (88)..(88)  
<223> Xaa en la posición 88 es Val o Leu

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (105) .. (105)  
<223> Xaa en la posición 105 es Gln o Gly

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (108)..(108)  
<223> Xaa en la posición 108 es Lys o Arg

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (109)..(109)  
<223> Xaa en la posición 109 es Val o Leu

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA  
<222> (14).. (14)  
<223> Xaa en la posición 14 es Thr o Ser

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (15)..(15)  
<223> Xaa en la posición 15 es Leu o Pro

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA  
<222> (30).. (30)  
<223> Xaa en la posición 30 es Ile o Val

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (50).. (50)  
<223> Xaa en la posición 50 es Arg, Gln o Lys

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (7).. (7)  
<223> Xaa en la posición 7 es Ser o Thr

<220>  
<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa en la posición 2 es Val o Ile

<400> 7

ES 2 391 905 T3

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

Arg

<210> 8  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo humanizado

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA DIVERSA  
 <222> (1) .. (112)  
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE ANTICUERPO HUMANIZADO

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (76).. (76)  
 <223> Xaa en la posición 76 es Lys o Arg

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (89) .. (89)  
 <223> Xaa en la posición 89 es Glu o Asp

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (107)..(107)  
 <223> Xaa en la posición 107 es Leu o Thr



<220>  
 <221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa en la posición 1 es Glu o Gln

<220>  
 <221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa en la posición 7 es Ser o Leu

<220>  
 <221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (46)..(46)  
 <223> Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser

<220>  
 <221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (63) .. (63)  
 <223> Xaa en la posición 63 es Thr o Ser

<220>  
 <221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (75) .. (75)  
 <223> Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val o Thr

<400> 8

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

<210> 9  
 <211> 113

ES 2 391 905 T3

<212> PRT

<213>Secuencia artificial

<220>

<223>Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (1) .. (113)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DE ANTICUERPO HUMANIZADO

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser  
20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213>Secuencia artificial

<220>

<223>Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (1)..(112)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DE ANTICUERPO HUMANIZADO

<400> 10

ES 2 391 905 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

<210> 11

<211> 219

<212> PRT

<213>Secuencia artificial

<220>

<223>Anticuerpo humanizado

<220>

<221>CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222>(1)..(219)

<223>CADENA LIGERA DE ANTICUERPO HUMANIZADO

<400> 11

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser  
 20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

ES 2 391 905 T3

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 12

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (1)..(442)

<223> CADENA LIGERA DE ANTICUERPO HUMANIZADO

ES 2 391 905 T3

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser





## ES 2 391 905 T3

<223> Xaa en la posición 8 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 8 es Asp o Pro

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (9)..(9)

<223> Xaa en la posición 9 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 8 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 9 no es Ser ni Thr

<400> 13

Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys
1				5					10					15	

**Gly**

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (1)..(112)

<223> Región Variable de Cadena Pesada de Anticuerpo Desglicosilado Humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (63) .. (63)

<223> Xaa en la posición 63 es Thr o Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa en la posición 1 es Glu o Gln

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (7)..(7)

<223> Xaa en la posición 7 es Ser o Leu

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (46)..(46)

<223> Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (56)..(56)

<223> Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn

<220>



## ES 2 391 905 T3

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (57)..(57)

<223> Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (58)..(58)

<223> Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es Ser ni Thr

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (75)..(75)

<223> Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val o Thr

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (76)..(76)

<223> Xaa en la posición 76 es Lys o Arg

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (89)..(89)

<223> Xaa en la posición 89 es Glu o Asp

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (107)..(107)

<223> Xaa en la posición 107 es Leu o Thr

<400> 14

ES 2 391 905 T3

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

<210> 15  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo humanizado

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (1)..(112)  
 <223> Región Variable de Cadena Pesada de Anticuerpo Desglicosilado Humanizado

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (56)..(56)  
 <223> Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (57)..(57)  
 <223> Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA  
 <222> (58)..(58)  
 <223> Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es Ser ni Thr

ES 2 391 905 T3

<400> 15

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

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

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

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

<210> 16

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Anticuerpo Humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (1)..(442)

<223> Cadena Pesada de Anticuerpo Humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (56)..(56)

<223> Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (57)..(57)

<223> Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_DIVERSA

<222> (58)..(58)

# ES 2 391 905 T3

<223> Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con la condición de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es Ser ni Thr

<400> 16

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

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

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

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 115 120 125

ES 2 391 905 T3

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
195 200 205

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
305 310 315 320

ES 2 391 905 T3

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 405 410 415

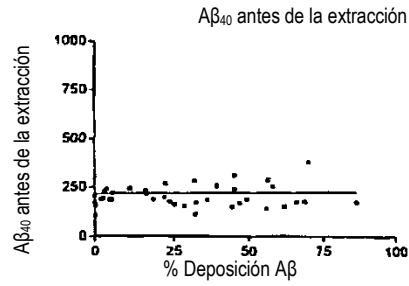
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 420 425 430 435

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440

## REIVINDICACIONES

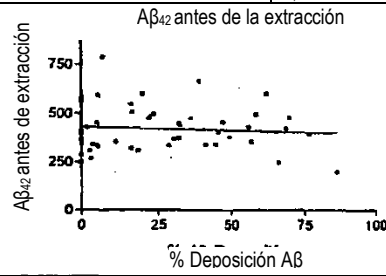
1. Un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica que comprende:
  - (a) medir el nivel de  $A\beta_{42}$  en una muestra de sangre de un individuo obtenida al cabo de un intervalo de tiempo después de administrar a dicho individuo una cantidad de un anticuerpo que se fija específicamente a un epítipo contenido en las posiciones 13-28 de  $A\beta$  o un anticuerpo que secuestra el péptido  $A\beta$  de su forma combinada circulante en la sangre y altera el aclaramiento de las formas soluble y combinada de  $A\beta$  en el sistema nervioso central en plasma, en donde dicha cantidad es eficaz para alterar los niveles de péptidos  $A\beta$  circulantes en la sangre de dicho individuo cuando dicho individuo se encuentra en una fase preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer; y
  - (b) comparar el nivel de  $A\beta_{42}$  en dicho individuo con un valor de control de dichos niveles, en donde los niveles elevados de  $A\beta_{42}$  en dicho individuo comparados con niveles de control identifican que dicho individuo se encuentra en una etapa preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer; en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende:
    - (i) una cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) siguientes: CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1; CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2; y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3; y
    - (ii) una cadena pesada que comprende las CDRs siguientes: CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 4; CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 5; y CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.6.
2. El método de la reivindicación 1, en el cual dicho intervalo de tiempo es menor que 1 semana.
3. El método de la reivindicación 1, en el cual dicho intervalo de tiempo es menor que o igual a 24 horas.
4. El método de la reivindicación 3, en el cual el intervalo de tiempo es menor que o igual a 3 horas.
5. El método de la reivindicación 1, en el cual dicha administración se realizó por inyección de dichos anticuerpos.
6. El método de la reivindicación 1, en el cual el individuo es humano y el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.
7. El método de la reivindicación 6, en el cual el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende una cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada SEQ ID NO: 12.
8. El método de la reivindicación 6, en el cual el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende una cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada SEQ ID NO: 16.
9. El método de la reivindicación 6, en el cual el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo comprende una cadena ligera que comprende una región variable de SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada que comprende una región variable de SEQ ID NO: 14.
10. El método de la reivindicación 1, en el cual dicho anticuerpo es un fragmento.
11. El método de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario.

A



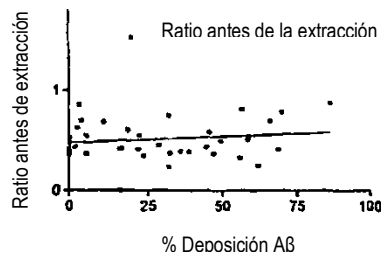
Parámetro	PB40
Número de Pares XY	42
Pearson r	0,02586
Intervalo de confianza 95%	-0,2804 a 0,3273
Valor P (dos colas)	0,8709
Sumario de valores P	ns
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	No
R cuadrado	0,0008685

B



Parámetro	PB42
Número de Pares XY	47
Pearson r	-0,07387
Intervalo de confianza 95%	-0,3536 a 0,2180
Valor P (dos colas)	0,6217
Sumario de valores P	Ns
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	No
R cuadrado	0,005456

C

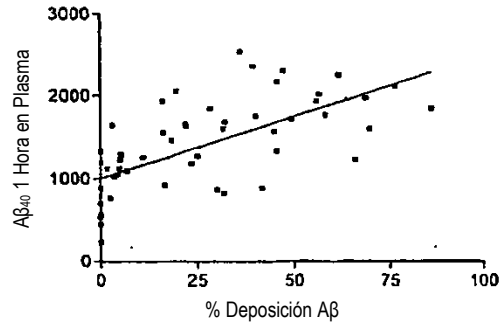


Parámetro	Ratio PB
Número de Pares XY	40
Pearson r	0,12313
Intervalo de confianza 95%	-0,1978 a 0,4171
Valor P (dos colas)	0,4560
Sumario de valores P	Ns
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	No
R cuadrado	0,01471

Figura 1

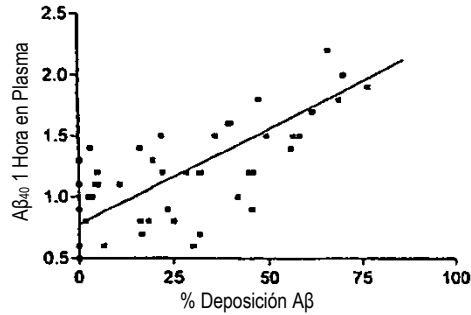


**A**  $A\beta_{40}$  en Plasma  
1 Hora después de la inyección de m266



Parámetro	1 hora 40
Número de Pares XY	52
Pearson r	0,6567
Intervalo de confianza 95%	0,4676 a 0,7884
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Sumario de valores P	***
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	Si
R cuadrado	0,4313

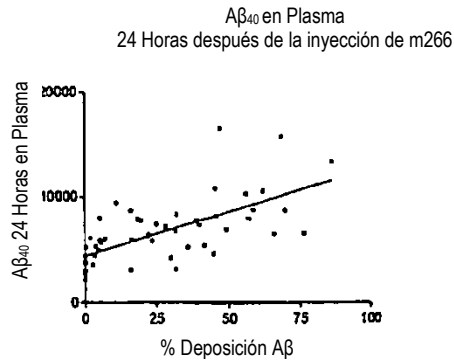
**B** Ratio  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  en Plasma 1 Hora después de la inyección de M266



Parámetro	1 Hora, Ratio
Número de Pares XY	52
Pearson r	0,7565
Intervalo de confianza 95%	0,6093 a 0,8533
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Sumario de valores P	***
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	Si
R cuadrado	0,5723

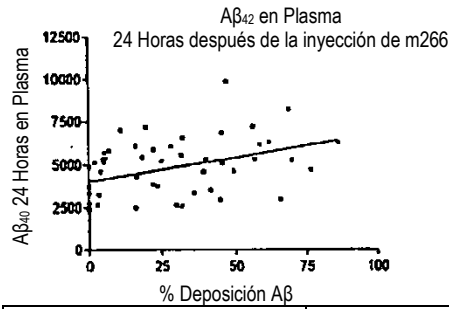
Figura 2

A



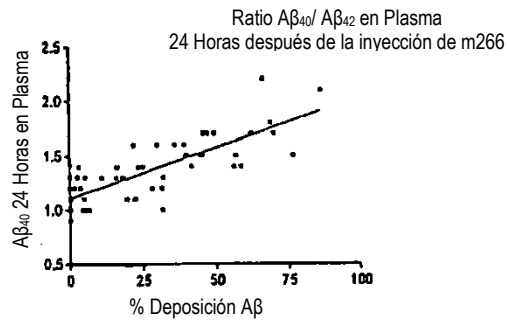
Parámetro	24 horas 40
Número de Pares XY	52
Pearson r	0,6628
Intervalo de confianza 95%	0,4759 a 0,7924
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Sumario de valores P	***
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	Sí
R cuadrado	0,4393

B



Parámetro	24 horas 42
Número de Pares XY	52
Pearson r	0,4039
Intervalo de confianza 95%	0,1471 a 0,6098
Valor P (dos colas)	0,0030
Sumario de valores P	**
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	Sí
R cuadrado	0,1631

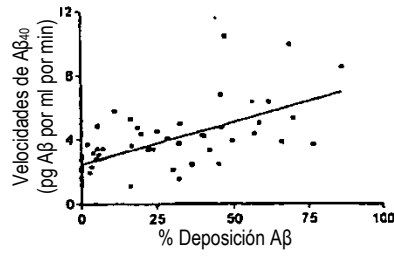
C



Parámetro	Ratio 24 horas
Número de Pares XY	52
Pearson r	0,7987
Intervalo de confianza 95%	0,6724 a 0,8799
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Sumario de valores P	***
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	Sí
R cuadrado	0,6380

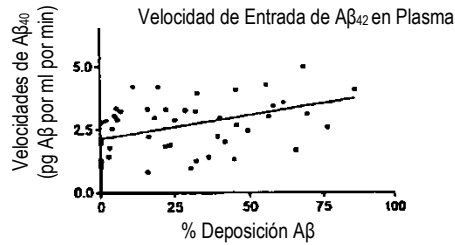
Figura 3

**A** Velocidad de Entrada de A $\beta$ <sub>40</sub> en Plasma



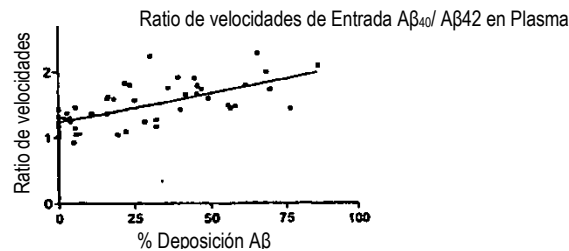
Parámetro	Pendiente de velocidad 40
Número de Pares XY	52
Pearson r	0,8360
Intervalo de confianza 95%	0,4394 a 0,7745
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Sumario de valores P	***
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	Si
R cuadrado	0,4046

**B**



Parámetro	Pendiente de velocidad 42
Número de Pares XY	52
Pearson r	0,4062
Intervalo de confianza 95%	0,1499 a 0,6114
Valor P (dos colas)	0,0028
Sumario de valores P	**
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	Si
R cuadrado	0,1850

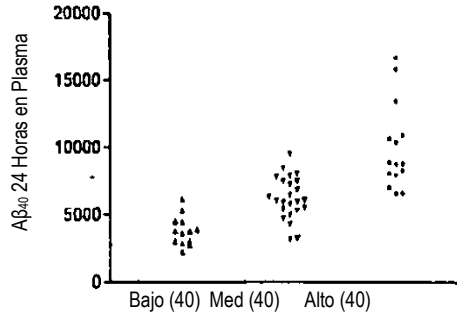
**C**



Parámetro	Ratio de Velocidades
Número de Pares XY	52
Pearson r	0,6551
Intervalo de confianza 95%	0,4653 a 0,7873
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Sumario de valores P	***
¿Es significativa la correlación? (alfa=0,05)	Si
R cuadrado	0,4291

Figura 4

**A**  $A\beta_{40}$  en Plasma  
24 Horas después de la inyección de m266

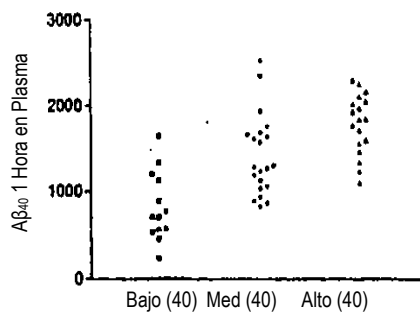


Cobertura de  $A\beta$  en el Hipocampo

Análisis de varianza de una sola vía	
Valor P	P<0,0001
Sumario de valores P	***
¿Son significativamente diferentes las medias? (P<0,05)	Si
Número de grupos	3
F	13,88
R cuadrado	0,3616

Test de Comparación Múltiple de Tukey	Valor P
Bajo (42) frente a Medio (42)	P<0,01
Bajo (42) frente a Alto (42)	P<0,001
Medio (42) frente a Alto (42)	P<0,05

**B**  $A\beta_{40}$  en Plasma  
1 Hora después de la inyección de m266



Cobertura de  $A\beta$  en el Hipocampo

Valor P	P<0,0001
Sumario de valores P	***
¿Son significativamente diferentes las medias? (P<0,05)	Si
Número de grupos	3
F	20,81
R cuadrado	0,4593

Test de Comparación Múltiple de Tukey	Valor P
Bajo (40) frente a Medio (40)	P<0,001
Bajo (40) frente a Alto (40)	P<0,001
Medio (40) frente a Alto (40)	P<0,05

**Figura 5**

Correlación de  $A\beta$  en Plasma con la Patología de Tipo Alzheimer en el Hipocampo

---

Correlación de  $A\beta$  en Plasma con la carga de  $A\beta$  y el amiloide fibrilar

	Pre-Extracción	5 Min	1 Hora	3 Horas	6 Horas	24 Horas	AUC
<b><math>A\beta_{40}</math> en Plasma:</b>							
Carga de $A\beta$ : Pearson r	-0.0158	0.5527	0.5904	0.4310	0.5533	0.5932	0.7056
Valor P	0.9209	<0.0001	<0.0001	0.0014	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Carga de amiloide: Pearson r	0.1535	0.7420	0.6257	0.7053	0.6684	0.7432	0.7624
Valor P	0.3378	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b><math>A\beta_{42}</math> en Plasma:</b>							
Carga de $A\beta$ : Pearson r	-0.0614	0.2223	-0.0036	0.1309	0.4551	0.3391	0.5322
Valor P	0.6817	0.1207	0.9798	0.3549	0.0008	0.0139	<0.0001
Carga de amiloide: Pearson r	0.0443	0.4790	0.2321	0.3996	0.4476	0.6062	0.6214
Valor P	0.7698	0.0005	0.1013	0.0037	0.0011	<0.0001	<0.0001
<b>Ratio <math>A\beta_{40}/42</math>:</b>							
Carga de $A\beta$ : Pearson r	0.0369	0.5223	0.6888	0.4215	0.1754	0.7190	0.6138
Valor P	0.8236	<0.0001	<0.0001	0.0019	0.2183	<0.0001	<0.0001
Carga de amiloide: Pearson r	0.1293	0.4825	0.5047	0.4364	0.2843	0.6029	0.5510
Valor P	0.4393	0.0004	0.0002	0.0014	0.0454	<0.0001	<0.0001

Figura 6