

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 732**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/00 (2006.01)

C07K 16/04 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2005** **E 05854354 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013** **EP 1838348**

54 Título: **Anticuerpos para beta-amiloide humanizados para su uso en mejorar la cognición**

30 Prioridad:

15.12.2004 US 636776 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.12.2013

73 Titular/es:

**JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
(50.0%)**

Airton Road Tallaght

Dublin 24, IE y

WYETH LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

BASI, GURIQ y

JACOBSON, JACK STEVEN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 434 732 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para beta-amiloide humanizados para su uso en mejorar la cognición.

5 Antecedentes de la invención

La memoria es una función cognitiva clave que implica el almacenamiento y/o recuperación por el cerebro de información recibida de experiencias pasadas. El aprendizaje, también denominado condicionamiento, es el proceso por el que se adquiere nueva información y es guardada por el sistema nervioso para formar una memoria. En pacientes con demencia, las rutas cognitivas para el aprendizaje y/o la memoria están alteradas, de forma que el paciente no logra aprender o formar nuevas memorias o recordar las antiguas. El número de individuos que presentan demencia está aumentando rápidamente, y se espera que la tasa de aumento aumente a medida que la población general continúe envejeciendo y la esperanza de vida continúe alargándose. Los pacientes con demencia requieren cuidados cada vez más costosos e intensos a medida que empeoran sus síntomas. Como tales, las intervenciones médicas que retrasan la institucionalización ayudarían a reducir las demandas de los sistemas sanitarios, además de aliviar los sufrimientos del sujeto con demencia.

El desarrollo de demencia profunda es característico de varios trastornos amiloidogénicos observados para la acumulación de depósitos de proteína amiloide en el tejido cerebral de sujetos afectados, que incluye síndrome de Down, angiopatía cerebral amiloide, demencias vasculares y enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es una enfermedad progresiva que produce demencia senil. En general, la enfermedad se clasifica en dos categorías: aparición tardía, que se produce en la edad anciana (+ 65 años) y aparición temprana, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre 35 y 60 años.

La neurodegeneración está asociada a trastornos amiloidogénicos y otros trastornos de demencia de forma que los síntomas cognitivos empeoran progresivamente con la edad. El diagnóstico de un trastorno amiloidogénico puede normalmente solo confirmarse por la patología celular distintiva que es evidente en la autopsia del cerebro. La histopatología consiste en al menos una de las tres características principales que incluyen la presencia de ovillos neurofibrilares (NT), la pérdida difusa de sinapsis y neuronas en los tejidos del sistema nervioso central y la presencia de placas de amiloide (también llamadas placas seniles). Véanse 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).

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

Varias mutaciones dentro de la proteína APP se han correlacionado con la presencia de EA. 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-metionina⁵⁹⁶ a asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶). Se cree que tales mutaciones producen EA 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 de amiloide en EA (Games y col., arriba, Johnson-Wood y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550 (1997)). En particular, cuando ratones transgénicos PDAPP (que expresan una forma mutante de APP humana y desarrollan la patología de EA a una edad joven) se inyectan con la forma larga de A β , muestran tanto una disminución en la progresión de la patología de EA como un aumento en los títulos de anticuerpos para el péptido A β (Schenk y col., Nature 400, 173 (1999)). Los hallazgos anteriores implican a A β , particularmente en su forma larga, como elemento causante en EA.

El péptido A β pueden existir en disolución y puede detectarse en el sistema nervioso central (CNS) (por ejemplo, en líquido cefalorraquídeo (LCR)) y plasma. Bajo ciertas condiciones, A β soluble se transforma en formas de hoja β tóxica fibrilar halladas en placas neuríticas y vasos sanguíneos cerebrales de pacientes con EA. Se han desarrollado varios tratamientos que intentan prevenir la formación del péptido A β , por ejemplo, el uso de inhibidores químicos para prevenir la escisión de APP. También se han desarrollado tratamientos inmunoterapéuticos como medio para reducir la densidad y el tamaño de placas existentes. Estas estrategias incluyen inmunización pasiva con diversos anticuerpos anti-A β que inducen la eliminación de depósitos de amiloide, además de inmunización activa con formas

solubles del péptido A β para promover una respuesta humoral que incluye la generación de anticuerpos anti-A β y la eliminación celular de los depósitos. Tanto la inmunización activa como la pasiva se han probado en modelos de ratón de EA. En ratones PDAPP se mostró que la inmunización con A β prevenía el desarrollo de la formación de placas, distrofia neurítica y astrogliosis. El tratamiento de animales ancianos también redujo significativamente el grado y progresión de estas neuropatologías similares a EA. Schenk y col., arriba. También se mostró que la inmunización con A β reducía placas y la alteración del comportamiento en el modelo murino TgCRND8 de EA. Janus y col. (2000) Nature 408:979-982. La inmunización con A β también mejoró el rendimiento cognitivo y redujo la carga de amiloide en los ratones mutantes Tg 2576 APP/PS1. Morgan y col. (2000) Nature 408:982-985. También se ha investigado la inmunización pasiva de ratones transgénicos PDAPP. Se encontró, por ejemplo, que anticuerpos periféricamente administrados entraron en el sistema nervioso central (CNS) e indujeron la eliminación de placas *in vivo*. Bard y col. (2000) Nat. Med. 6:916-919. Se mostró adicionalmente que los anticuerpos indujeron fagocitosis mediada por receptor de Fc en ensayo *ex vivo*. Se ha demostrado que los anticuerpos específicos para el extremo N de A β 42 son particularmente eficaces en reducir la placa tanto *ex vivo* como *in vivo*. Véanse la patente de EE.UU. nº 6.761.888 y Bard y col. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2023-2028. Los anticuerpos específicos para la región media de A β 42 también mostraron eficacia. Véase la patente de EE.UU. nº 6.761.888. El documento WO-A-03/016467 describe un procedimiento para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o afección relacionada con el péptido A β usando un anticuerpo que tiene una afinidad por A β soluble superior a 10^{-9} M. En este documento, el anticuerpo 266 mejora la cognición en ratones PDAPP.

Se han propuesto dos mecanismos para la eliminación eficaz de placas por inmunoterapéuticos, es decir, degradación central y degradación periférica. El mecanismo de degradación central se basa en anticuerpos que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, unirse a las placas e inducir la eliminación de placas preexistentes. Se ha mostrado que la eliminación se promueve mediante una fagocitosis mediada por receptor de Fc (Bard y col. (2000) Nat. Med. 6:916-19). El mecanismo de degradación periférica de la eliminación de A β se basa en una rotura del equilibrio dinámico de A β entre cerebro, LCR y plasma por anticuerpos anti-A β , conduciendo al transporte de A β de un compartimento al otro. A β centralmente derivado se transporta al LCR y el plasma en los que se degrada. Estudios recientes han concluido que A β soluble y sin unir participan en la alteración de la memoria asociada a EA, incluso sin reducción en la deposición de amiloide en el cerebro. Se necesitan estudios adicionales para determinar la acción y/o interacción de estas rutas para la eliminación de A β (Dodel y col., The Lancet, 2003, 2:215)

Aunque la mayoría de los tratamientos hasta la fecha han tenido como objetivo reducir la formación de placas de amiloide, se ha observado recientemente que ciertos deterioros cognitivos (por ejemplo, defectos del condicionamiento dependiente del hipocampo) asociados a trastornos amiloidogénicos empiezan a aparecer antes de que los depósitos de amiloide y la neuropatología macroscópica sean evidentes (Dineley y col., J. Biol. Chem., 2002, 277: 22768). Además, aunque la función patogénica del péptido amiloide agregado en placas se conoce desde hace muchos años, la gravedad de la demencia o déficits cognitivos es solo algo correlacionado con la densidad de placas, considerando que existe una correlación significativa con los niveles de A β soluble (véase, por ejemplo, McLean y col., Ann Neurol, 46:860-866 (1999)). Algunos estudios han mostrado o sugerido que oligómeros de A β soluble participan en sinaptotoxicidad y alteración de la memoria en ratones transgénicos APP debido a mecanismos que incluyen elevado estrés oxidativo e inducción de muerte celular programada (véase, por ejemplo, Lambert y col., (1998), PNAS, 95: 6448-53; Naslund y col., (2000), JAMA, 283: 1571; Mucke y col., J Neurosci, 20:4050-4058 (2000); Morgan y col., Nature, 408:982-985 (2000); Dodart y col., Nat Neurosci, 5:452-457 (2002); Selkoe y col., (2002), Science, 298: 789-91; Walsh y col., Nature, 416:535-539 (2002)). Estos resultados indican que la neurodegeneración puede empezar antes de, y no es únicamente el resultado de, la deposición de amiloide. Por consiguiente, existe la necesidad de nuevas terapias y reactivos para el tratamiento de EA, en particular terapias y reactivos que puedan efectuar un beneficio terapéutico mediante intervención con diversos mecanismos de neurotoxicidad inducida por A β .

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a reactivos inmunológicos, en particular, reactivos de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con A β y/o enfermedades o trastornos amiloidogénicos (por ejemplo, EA). La invención se basa, al menos en parte, en la identificación y caracterización de un anticuerpo monoclonal, 12A11, que se une específicamente al péptido A β y es eficaz en la reducción de la carga de placas asociada a trastornos amiloidogénicos (por ejemplo, EA). 12A11 también presenta unión preferencial por A β oligomérico soluble y es eficaz en mejorar la cognición en un modelo animal de EA. 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 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.

La presente invención caracteriza reactivos inmunológicos y se refiere a procedimientos mejorados para prevenir o tratar EA u otras enfermedades amiloidogénicas. La invención se basa, al menos en parte, en la caracterización de una inmunoglobulina monoclonal, 12A11, eficaz en la unión a proteína beta-amiloide (A β) (por ejemplo, unión a A β soluble y/o agregada), mediación en fagocitosis (por ejemplo, de A β agregado), reducción de la carga de placas,

reducción de la distrofia neurítica y/o mejora de la cognición (por ejemplo, en un sujeto). 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 12A11 y la identificación de residuos importantes para la actividad e inmunogenicidad.

Se muestra que las inmunoglobulinas incluyen una cadena ligera variable y/o pesada variable de la inmunoglobulina monoclonal 12A11 descrita en el presente documento. Se muestran inmunoglobulinas preferidas, por ejemplo, inmunoglobulinas terapéuticas, que incluyen una cadena ligera variable humanizada y/o pesada variable humanizada. Cadenas ligeras variables y/o pesadas variables preferidas incluyen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la inmunoglobulina 12A11 (por ejemplo, inmunoglobulina donante) y regiones estructurales variables de o 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.

La invención proporciona un uso médico de un anticuerpo 12A11 monoclonal, quimérico o humanizado que comprende las CDR de 12A11, como se definen en la reivindicación 1. En una realización, la invención caracteriza una inmunoglobulina humanizada que incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de 12A11 (es decir, incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 4), e incluye una región estructural variable de una secuencia de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, que opcionalmente tiene al menos un residuo del residuo de la región estructural retromutado a un residuo murino correspondiente, en la que dicha retromutación no afecta sustancialmente la capacidad de la cadena para dirigir la unión de Aβ.

En una realización, la invención caracteriza una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de 12A11 (es decir, incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 4), e incluye una región estructural variable sustancialmente de una secuencia de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, que opcionalmente tiene al menos un residuo del residuo de la región estructural retromutado a un residuo murino correspondiente, en la que dicha retromutación no afecta sustancialmente la capacidad de la cadena para dirigir la unión de Aβ.

En otra realización, la invención caracteriza una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de 12A11 (por ejemplo, incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 4), e incluye una región estructural variable sustancialmente de una secuencia de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, que opcionalmente tiene al menos un residuo de la región estructural sustituido con el residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de la región variable de la cadena ligera o pesada de 12A11 de ratón, en la 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 que interacciona 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 de VL-VH.

En otra realización, la invención caracteriza una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye las CDR de la región variable de 12A11 y regiones estructurales variables de una secuencia de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, que opcionalmente tiene al menos un residuo de la región estructural sustituido con el residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de la región variable de la cadena ligera o pesada de 12A11 de ratón, en la 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 ha identificado por análisis de un modelo tridimensional de la región variable, por ejemplo, un residuo que puede interaccionar con antígeno, un residuo proximal al sitio de unión a antígeno, un residuo que puede interaccionar 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 compactación entre cadenas, un residuo raro, 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.

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. La inmunoglobulina humanizada se une (por ejemplo, se une específicamente a) a péptido beta-amiloide (A β) con una afinidad de unión de al menos 10^7 M $^{-1}$, 10^8 M $^{-1}$ ó 10^9 M $^{-1}$. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno incluye una cadena pesada que tiene isotipo $\gamma 1$. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno se une (por ejemplo, se une específicamente a) a uno cualquiera o ambos de péptido beta-amiloide soluble (A β) y A β agregado. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno captura A β soluble (por ejemplo, A β 1-42 soluble). En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno media en fagocitosis (por ejemplo, induce fagocitosis) de péptido beta-amiloide (A β). En otra realización más, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno cruza la barrera hematoencefálica en un sujeto. En otra realización más, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno reduce una cualquiera o ambas de la carga de péptido beta-amiloide (A β) y distrofia neurítica en un sujeto.

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

Las inmunoglobulinas en el presente documento se describen particularmente aptas para uso en procedimientos terapéuticos que tienen como objetivo prevenir o tratar enfermedad o trastornos relacionados con A β o enfermedades o trastornos amiloidogénicos. Se describe un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades o trastornos amiloidogénicos (por ejemplo, EA) que implica administrar al paciente una dosificación eficaz de una inmunoglobulina humanizada como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, la divulgación presenta procedimientos terapéuticos y/o profilácticos eficaces en prevenir o mejorar la demencia y/o déficits cognitivos que se observan en pacientes con enfermedades o trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, enfermedad o trastornos relacionados con A β). En particular, la invención proporciona procedimientos terapéuticos y/o profilácticos mejorados que comprenden la administración de agentes terapéuticos que interfieren con etapas tempranas en la patogénesis de las enfermedades o trastornos y previenen la lesión neural irreversible y/o demencia. Los anticuerpos de la presente invención son útiles en procedimientos para mejorar rápidamente la cognición en un sujeto que implican administración de un reactivo inmunológico de 12A11, o composición farmacéutica que comprende dicho reactivo. Reactivos inmunológicos de 12A11 preferidos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos 12A11, anticuerpos 12A11 humanizados, anticuerpos 12A11 quiméricos, anticuerpos 12A11 monocatenarios, anticuerpos 12A11 biespecíficos, fragmentos de anticuerpos 12A11, cadenas de anticuerpos 12A11, variantes de los mismos (por ejemplo, variantes de anticuerpos Fc 12A11), o combinaciones de los mismos.

También se describen procedimientos para efectuar la mejora prolongada de la cognición en un sujeto que implican la administración de un reactivo inmunológico de 12A11 o composición farmacéutica que comprende dicho reactivo.

También se describe la administración de un reactivo inmunológico de 12A11, que es eficaz en unir A β , en particular oligómeros de A β , reducir la carga de amiloide y/o mejorar rápidamente la cognición en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno de demencia, por ejemplo, una enfermedad o trastorno relacionado con A β .

En otras realizaciones, la invención presenta polipéptidos que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal 12A11, que incluyen reactivos de polinucleótido, vectores y células huésped adecuadas que codifican dichos polipéptidos.

En otras realizaciones, la invención presenta composiciones farmacéuticas que incluyen una inmunoglobulina humanizada como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéutico. También se presentan moléculas de ácidos nucleicos aisladas, vectores y células huésped que producen 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 divulgación describe adicionalmente procedimientos para identificar residuos de 12A11 aceptados para sustitución cuando se produce una inmunoglobulina humanizada 12A11, respectivamente. Por ejemplo, un procedimiento para identificar residuos de la región estructural variable aceptados para sustitución implica modelar la estructura tridimensional de una región variable de 12A11 en una estructura de inmunoglobulina homóloga resuelta y analizar dicho modelo para residuos que puedan afectar la conformación o función de la región variable de la inmunoglobulina 12A11, de forma que se identifiquen residuos aceptados para sustitución. La divulgación describe adicionalmente el uso de la secuencia de la región variable expuesta como SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, o cualquier porción de la misma, en la producción de una imagen tridimensional de una inmunoglobulina 12A11, cadena de inmunoglobulina 12A11, 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. En algunas realizaciones, una inmunoglobulina de la invención comprende una o más alteraciones de aminoácidos en la región bisagra, por ejemplo, en las posiciones EU 234, 235, 236 y 237. En una realización particular, una inmunoglobulina según la invención es un anticuerpo 12A11 humanizado que incluye alteraciones de aminoácidos en las posiciones 234 y 237 de la región de unión bisagra (es decir, L234A y G237A).

En otras realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención comprenden fragmentos de anticuerpos PEGilados, por ejemplo, Fabs y Fab's. En todavía otras realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención comprenden una región constante aglucosilada. En una realización a modo de ejemplo, una inmunoglobulina incluye una sustitución de aminoácidos de una asparagina en la posición 297 a una alanina, previniendo así la glucosilación de la inmunoglobulina.

Breve descripción de los dibujos

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

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

La *Figura 3* representa una transferencia Western de inmunoprecipitados de la preparación de A β ₁₋₄₂ oligomérico tratada con peroxinitrito precipitada con diversos anticuerpos para A β (3D6, 6C6, 12A11, 12B4, 3A3, 266, 9G8, 15C11 y 6H9) e imágenes obtenidas con 3D6. Las posiciones aproximadas de las bandas de monómero, dímero, trímero y tetrámero de A β ₁₋₄₂ se indican en el lado izquierdo de la figura. Debajo de cada anticuerpo para A β se indica el epítipo de A β reconocido por el anticuerpo y los resultados del ensayo de condicionamiento de miedo contextual (CFC) para el anticuerpo, una notación "+" indica una observación de elevada cognición tras el tratamiento con el anticuerpo, una notación "-" indica una observación de sin cambio en la cognición tras el tratamiento con el anticuerpo, una notación "+/-" indica una observación de una tendencia de cognición elevada tras el tratamiento con el anticuerpo, pero la tendencia observada no fue estadísticamente suficientemente significativa para ser indicada como una observación de cognición elevada, y la notación "ND" indica datos de ensayo de CFC no comparados para este anticuerpo.

La *Figura 4* representa una transferencia Western de inmunoprecipitados de la preparación de A β ₁₋₄₂ oligomérico tratada con peroxinitrito precipitada con diversos anticuerpos para A β (3D6, 6C6, 12A11, 12B4, 10D5, 3A3, 266 y 6H9) e imágenes obtenidas con 3D6. La anotación es la misma que para la *Figura 3*.

La *Figura 5A* representa los resultados de un ensayo de CFC en el que se observa una rápida mejora en la cognición tras la administración de dosis únicas de 12A11 murino (1, 10 y 30 mg/kg) a ratones Tg2576. La *Figura 5B* representa los resultados de un ensayo de CFC en el que se observa una rápida mejora en la cognición tras la administración de dosis bajas únicas de 12A11 murino (0,3 y 1 mg/kg) a ratones Tg2576.

La *Figura 6* representa los resultados de un estudio en el que la duración de la cognición mejorada tras la administración de una dosis única de 12A11 murino (1 mg/kg) se evalúa 1, 10 y 17 días después de la administración en un ensayo de condicionamiento de miedo contextual (CFC).

La *Figura 7A* representa una secuencia de ADN que incluye la secuencia de la cadena VH de 12A11 murino y la secuencia de aminoácidos deducida para la cadena VH (SEC ID N°: 6 y 3, respectivamente). La cadena VH madura se indica por una barra negra rellena. Las CDR se indican por barras blancas. Las secuencias de ADN incluyen sitios de clonación y secuencias de Kozak (en la dirección 5' de secuencias codificantes) y secuencias de corte y empalme y de clonación (en la dirección 3'). La *Figura 7B* representa una secuencia de ADN que incluye la cadena VL de 12A11 murino y la secuencia de aminoácidos deducida para la cadena VL (SEC ID N°: 5 y 2, respectivamente). La cadena VL madura se indica por una barra negra rellena. Las CDR se indican por barras blancas.

La *Figura 8* representa gráficamente los resultados de ELISA de un experimento que mide la unión de 12A11 quimérico, 3D6 quimérico y humanizado (h3D6), y 12B4 quimérico y humanizado a A β ₁₋₄₂.

La *Figura 9A* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpos 12A11 murinos (o quiméricos) (SEC ID N°: 2), 12A11 humanizados (péptido maduro, SEC ID N°: 7), de GenBank BAC01733 (SEC ID N°: 8) y A19 de la línea germinal (X63397, SEC ID N°: 9). Las regiones CDR están recuadradas. Los residuos de compactación están subrayados. Numerados desde la primera metionina, no la numeración de Kabat. La *Figura 9B* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpos 12A11 murinos (o quimérico) (SEC ID N°: 4), 12A11 humanizados (versión 1) (péptido maduro, SEC ID N°: 10), de GenBank AAA69734 (SEC ID N°: 11) y de

567123 de GenBank de la línea germinal (SEC ID N°: 12). Los residuos de compactación están subrayados, los residuos canónicos están en línea continua y los residuos de vernier están en línea discontinua. Numerados desde la primera metionina, no la numeración de Kabat.

La *Figura 10A-B* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de 12A11 v1 (SEC ID N°: 10), v2 (SEC ID N°: 13), v2.1 (SEC ID N°: 14), v3 (SEC ID N°: 15), v3.1 (SEC ID N°: 36), v4.1 (SEC ID N°: 16), v4.2 (SEC ID N°: 17), v4.3 (SEC ID N°: 18), v4.4 (SEC ID N°: 19), v5.1 (SEC ID N°: 20), v5.2 (SEC ID N°: 21), v5.3 (SEC ID N°: 22), v5.4 (SEC ID N°: 23), v5.5 (SEC ID N°: 24), v5.6 (SEC ID N°: 25), v6.1 (SEC ID N°: 26), v6.2 (SEC ID N°: 27), v6.3 (SEC ID N°: 28), v6.4 (SEC ID N°: 29), v7 (SEC ID N°: 30) y v8 (SEC ID N°: 31) humanizado. La *Figura 10C* expone las retromutaciones hechas en 12A11 v1 a v8 humanizado.

La *Figura 11* representa los resultados de un ELISA de A β (1-42) agregado que compara 12A11 quimérico, 12A11 v1 humanizado, 12A11 v2 humanizado, 12A11 v2.1 humanizado y 12A11 v3 humanizado.

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

La *Figura 13* representa los resultados de un ensayo de ELISA de unión de A β 1-42 competitivo que compara 12A11 murino, 12A11 quimérico, h12A11 v1, h12A11 v2, h12A11 v3 y h12A11 v3.1.

La *Figura 14* representa los resultados de un ensayo de CFC en el que se observa una rápida mejora en la cognición tras la administración de dosis únicas del anticuerpo 12A11 v3.1 humanizado h12A11 (1, 10 y 30 mg/kg) a ratones Tg2576.

Descripción detallada de la invención

I) Definiciones

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 “enfermedad o trastorno relacionado con A β ” como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad o trastorno asociado a, o caracterizado por, el desarrollo o presencia de un péptido A β . En una realización, la enfermedad o trastorno relacionado con A β está asociado a o caracterizado por la presencia de A β soluble. En otra realización, la enfermedad o trastorno relacionado con A β está asociado a o caracterizado por la presencia de A β insoluble. En otra realización, la enfermedad o trastorno relacionado con A β está asociado a o caracterizado por la presencia de una especie de A β neuroactiva (NA β). En otra realización, la enfermedad o trastorno relacionado con A β también es un trastorno amiloidogénico. En otra realización, la enfermedad o trastorno relacionado con A β se caracteriza por un déficit cognitivo relacionado con A β o trastorno, por ejemplo, un trastorno de demencia relacionado con A β . Enfermedades o trastornos relacionados con A β a modo de ejemplo incluyen enfermedad de Alzheimer (EA), síndrome de Down, angiopatía cerebral amiloide, ciertas demencias vasculares y deterioro cognitivo leve (MCI).

Los términos “proteína β -amiloide”, “péptido β -amiloide”, “ β -amiloide”, “A β ” y “péptido A β ” se usan indistintamente en el presente documento. El péptido A β (por ejemplo, A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43) es un fragmento interno de -4 kDa de 39-43 aminoácidos de la gran glucoproteína transmembrana llamada proteína precursora de amiloide (APP). Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. A los aminoácidos dentro de APP se les asignan números según la secuencia de la isoforma de APP¹⁷⁰ (véase, por ejemplo, n° de acceso de GenBank P05067). Ejemplos de isotipos específicos de APP que se sabe actualmente que existen en seres humanos son el polipéptido de 695 aminoácidos descrito por Kang y col. (1987) Nature 325:733-736, que se designa el APP “normal”; el polipéptido de 751 aminoácidos descrito por Ponte y col. (1988) Nature 331:525-527 (1988) y Tanzi y col. (1988) Nature 331:528-530; y el polipéptido de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi y col. (1988) Nature 331:530-532. Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas secretasas *in vivo* o *in situ*, A β se encuentra en tanto una “forma corta”, 40 aminoácidos de longitud, como una “forma larga”, que oscila de 42-43 aminoácidos de longitud. La forma corta, A β ₄₀, consiste en los residuos 672-711 de APP. La forma larga, por ejemplo, A β ₄₂ o A β ₄₃, consiste en los residuos 672-713 ó 672-714, respectivamente. Parte del dominio hidrófobo de APP se encuentra en el extremo carboxi de A β , y puede explicar la capacidad de A β para agregarse, particularmente en el caso de la forma larga. El péptido A β puede encontrarse en, o purificarse a partir de, los fluidos corporales de seres humanos y otros mamíferos, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, que incluye tanto individuos normales como individuos que padecen trastornos amiloidogénicos.

Los términos “proteína β -amiloide”, “péptido β -amiloide”, “ β -amiloide”, “A β ” y “péptido A β ” incluyen péptidos resultantes de la escisión por secretasa de APP y péptidos sintéticos que tienen la misma o esencialmente la misma secuencia que los productos de escisión. Los péptidos A β de la invención pueden derivarse de una variedad de fuentes, por ejemplo, tejidos, líneas celulares o fluidos corporales (por ejemplo, sueros o líquido cefalorraquídeo). Por ejemplo, un A β puede derivarse de células que expresan APP tales como células de ovario de hámster chino (CHO) establemente transfectadas con APP^{717V→F} como se describe, por ejemplo, en Walsh y col., (2002), Nature, 416, pág. 535-539. Una preparación de A β puede derivarse de fuentes de tejido usando procedimientos previamente descritos (véase, por ejemplo, Johnson-Wood y col., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550). Alternativamente, los péptidos A β pueden sintetizarse usando procedimientos que son muy conocidos para aquellos en la materia.

Véanse, por ejemplo, Fields y col., *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1992, pág. 77). De ahí, los péptidos pueden sintetizarse usando las técnicas de Merrifield automatizadas de síntesis en fase sólida con el grupo α -amino protegido por tanto química de t-Boc como de F-moc usando aminoácidos protegidos en la cadena lateral en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems modelo 430A o 431. Pueden sintetizarse antígenos de péptidos más largos usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el péptido o péptido de fusión puede sintetizarse o clonarse molecularmente e insertarse en un vector de expresión adecuado para la transfección y expresión heteróloga por una célula huésped adecuada. El péptido A β también se refiere a secuencias de A β relacionadas que resultan de mutaciones en la región A β del gen normal.

El término "A β soluble" o "A β disociado" se refiere al polipéptido A β no agregante o desagregado que incluye polipéptido A β soluble monomérico, además de soluble oligomérico (por ejemplo, dímeros, trímeros de A β soluble y similares). A β soluble puede encontrarse *in vivo* en fluidos biológicos tales como líquido cefalorraquídeo y/o suero. A β soluble también puede prepararse *in vitro*, por ejemplo, solubilizando el péptido A β en disolventes y/o disoluciones apropiadas. Por ejemplo, A β soluble puede prepararse disolviendo péptido liofilizado en alcohol, por ejemplo, HFIP, seguido de dilución en disolución acuosa fría. Alternativamente, A β soluble puede prepararse disolviendo péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La disolución resultante puede centrifugarse (por ejemplo, a 14.000 x g, 4 °C, 10 minutos) para eliminar cualquier partícula insoluble.

El término "A β insoluble" o "A β agregado" se refiere a polipéptido A β agregado, por ejemplo, A β mantenido junto por enlaces no covalentes y que puede producirse en la forma de hoja β tóxica fibrilar del péptido A β que se encuentra en placas neuríticas y vasos sanguíneos cerebrales de pacientes con EA. Se cree que A β (por ejemplo, A β 42) 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).

Como se usa en el presente documento, el término "especie de A β neuroactiva" se refiere a una especie de A β (por ejemplo, un péptido A β o forma de péptido A β) que afecta a al menos una actividad o característica física de una célula neuronal. Las especies de A β neuroactivas afectan, por ejemplo, la función, actividad biológica, viabilidad, morfología y/o arquitectura de una célula neuronal. El efecto sobre células neuronales puede ser celular, por ejemplo, afectando la potenciación a largo plazo (LPT) de una célula neuronal o viabilidad de una célula neuronal (neurotoxicidad). Alternativamente, el efecto puede ser sobre un sistema neuronal *in vivo*, por ejemplo, afectando un desenlace del comportamiento en una prueba con animales apropiada (por ejemplo, una prueba cognitiva). El término "neutralizan" como se usa en el presente documento significar hacer neutro, contrarrestar o hacer ineficaz una actividad o efecto.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad neurodegenerativa" se refiere ampliamente a trastornos o enfermedades asociadas a o caracterizadas por degeneración de neuronas y/o tejidos nerviosos, por ejemplo, una enfermedad amiloidogénica.

El término "enfermedad amiloidogénica" o "trastorno amiloidogénico" 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 (EA), angiopatía cerebral amiloide (ACA), diabetes de aparición en la madurez, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia fronto-temporal y las encefalopatías espongiformes transmisibles relacionadas con priones (kuru y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en seres humanos y encefalopatía espongiforme 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 principal componente de polipéptido del depósito de amiloide. Por consiguiente, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una "enfermedad caracterizada por depósitos de A β " o una "enfermedad asociada a depósitos de A β ", por ejemplo, en el cerebro de un sujeto o paciente. Otras enfermedades caracterizadas por depósitos de A β pueden incluir enfermedades sin caracterizar en las que los depósitos amiloidogénicos se encuentran en una o más regiones del cerebro asociadas al aprendizaje y/o la memoria, por ejemplo, el hipocampo, amígdala, subículo, corteza del cíngulo, corteza prefrontal, corteza perirrinal, corteza sensorial y lóbulo temporal medial.

El término "cognición" se refiere a procesos mentales cognitivos realizados por un sujeto que incluyen, pero no se limitan a, aprendizaje o memoria (por ejemplo, aprendizaje o memoria a corto plazo o a largo plazo), conocimiento, conciencia, atención y concentración, juicio, reconocimiento visual, pensamiento abstracto, funciones ejecutivas, lenguaje, habilidades visoespaciales (es decir, orientación visoespacial), reconocimiento visual, equilibrio/agilidad y actividad sensoriomotora. Procesos cognitivos a modo de ejemplo incluyen aprendizaje y memoria.

Los términos "trastorno cognitivo", "déficit cognitivo" o "deterioro cognitivo" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una deficiencia o alteración en uno o más procesos mentales cognitivos de un sujeto. Los déficits cognitivos pueden tener varios orígenes: un mecanismo funcional (ansiedad, depresión), envejecimiento fisiológico (alteración de la memoria asociada con la edad), lesión cerebral, trastornos psiquiátricos (por ejemplo esquizofrenia), fármacos, infecciones, productos tóxicos o lesiones anatómicas. Déficits cognitivos a modo de

ejemplo incluyen deficiencia o alteración en el aprendizaje o memoria (por ejemplo, en aprendizaje a corto plazo o a largo plazo y/o pérdida de memoria de capacidades intelectuales, juicio, lenguaje, habilidades motoras y/o pensamiento abstracto).

Como se usa en el presente documento, el término “trastorno cognitivo relacionado con A β ” (o “déficit” o “alteración”) se refiere a un trastorno cognitivo asociado a, o caracterizado por, el desarrollo o presencia de un péptido A β . En una realización, la enfermedad o trastorno relacionado con A β está asociado a o caracterizado por la presencia de A β soluble. En otra realización, la enfermedad o trastorno relacionado con A β está asociado a o caracterizado por la presencia de A β insoluble. En otra realización, la enfermedad o trastorno relacionado con A β está asociado a o caracterizado por la presencia de una especie de A β neuroactiva (NA β).

El término “trastorno de demencia”, como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno caracterizado por demencia (es decir, deterioro general o disminución progresiva de las capacidades cognitivas o síntomas relacionados con la demencia). Los trastornos de demencia frecuentemente están asociados a, o se producen por, uno o más procesos anómalos en el cerebro o sistema nervioso central (por ejemplo, neurodegeneración). Los trastornos de demencia comúnmente progresan de etapas leves a graves e interfieren con la capacidad de un sujeto para funcionar independientemente en la vida diaria. La demencia puede clasificarse como cortical o subcortical dependiendo del área del cerebro afectada. Los trastornos de demencia no incluyen trastornos caracterizados por una pérdida de conciencia (como en delirio) o depresión, u otros trastornos mentales funcionales (pseudodemencia). Los trastornos de demencia incluyen demencias irreversibles tales como enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de Jakob-Creutzfeldt, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, demencia del lóbulo frontal, calcificación de ganglios basales idiopáticos, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson, además de demencias reversibles debidas a traumatismo (encefalopatía postraumática), tumores intracraneales (primarios o metastásicos), hematomas subdurales, condiciones metabólicas y endocrinológicas (hipo- e hipertiroidismo, enfermedad de Wilson, encefalopatía urémica, demencia por diálisis, demencia anóxica y post-anóxica y trastornos crónicos por electrolitos), estados de deficiencia (deficiencia de vitamina B12 y pelagra (vitamina B6)), infecciones (SIDA, meningoencefalitis sifilítica, encefalitis límbica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, infecciones fúngicas, tuberculoculosis) y exposición crónica a alcohol, aluminio, metales pesados (arsénico, plomo, mercurio, manganeso), o medicamentos de venta con receta (anticolinérgicos, sedantes, barbitúricos, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término “trastorno de demencia relacionado con A β ” se refiere a un trastorno de demencia asociado a, o caracterizado por, el desarrollo o presencia de un péptido A β .

Como se usa en el presente documento, el término “mejora en la cognición” se refiere a un potenciamiento o aumento en la habilidad o función cognitiva. Asimismo, el término “que mejora la cognición” se refiere al potenciamiento o aumento de una habilidad o función cognitiva. Una mejora en la cognición está relacionada, por ejemplo, con la cognición en el sujeto antes de un tratamiento según la presente invención. Preferentemente, la mejora en la cognición tiende hacia la de un sujeto normal o hacia un nivel convencional o esperado.

El término “rápido”, como se usa, por ejemplo, en el término “rápida mejora en la cognición” (o “cognición que mejora rápidamente”) significa que dura un tiempo relativamente o comparativamente corto o que se produce dentro de un intervalo de tiempo comparativamente corto; es decir, que un efecto (por ejemplo, mejora) se lleve a cabo, se observe o alcance comparativamente rápidamente, en términos de relevancia clínica (es decir, como se entiende por un profesional clínico en la materia).

Una “rápida mejora en la cognición” a modo de ejemplo se lleva a cabo, se observa o se alcanza dentro de un día (es decir, dentro de 24 horas). Una “rápida mejora en la cognición” puede llevarse a cabo, observarse o alcanzarse en menos de un día (es decir, inferior a 24 horas), por ejemplo, dentro de 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 hora(s). Una “rápida mejora en la cognición” puede llevarse a cabo, observarse o alcanzarse alternativamente en más de un día, pero preferentemente dentro de un mes, por ejemplo, dentro de 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2 días. Intervalos de tiempo a modo de ejemplo para llevar a cabo, observar o alcanzar una rápida mejora en la cognición están dentro de semanas, por ejemplo, dentro de tres semanas, dentro de dos semanas o dentro de una semana o dentro de, por ejemplo, 120 horas, 96 horas, 72 horas, 48 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas y/o 6 horas.

El término “prolongado”, como se usa, por ejemplo, en el término “mejora prolongada en la cognición” significa que se produce durante un intervalo de tiempo comparativamente o relativamente más largo que un control adecuado; es decir, que un efecto deseado (por ejemplo, mejora) se produce o se observa que es sostenido sin interrupción durante un periodo de tiempo prolongado o extendido, en términos de relevancia clínica (es decir, como se entiende por un profesional clínico en la materia).

Un “mejora prolongada en la cognición” a modo de ejemplo se lleva a cabo, se observa o se alcanza durante al menos un semana. Una “mejora prolongada en la cognición” puede llevarse a cabo, observarse o alcanzarse durante más de un día (es decir, superior a 24 horas), por ejemplo, durante más de 36 horas, 48 horas (es decir, 2 días), 72 horas (es decir, 3 días), 96 horas (es decir, 4 días), 108 horas (es decir, 5 días) o 132 horas (es decir, 6 días).

días). Una “mejora prolongada en la cognición” puede llevarse a cabo, observarse o alcanzarse alternativamente durante más de un semana, por ejemplo, durante 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 días (es decir, dos semanas), tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, o más. Intervalos de tiempo a modo de ejemplo durante los cuales se realiza, se observa o se alcanza una mejora prolongada en la cognición incluyen 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 días.

El término “modulación”, como se usa en el presente documento, se refiere a tanto la regulación por incremento, es decir, estimulación, como la regulación por disminución, es decir, supresión, de una respuesta.

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 o línea celular aislado 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, recuperar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia enfermedad.

El término “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos alcanzar 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 enfermedad, la fisiología general del paciente, por ejemplo, la masa corporal del paciente, edad, sexo, la vía de administración, y otros factores muy conocidos para médicos y/o farmacólogos. Dosis eficaces pueden expresarse, por ejemplo, como la masa total de anticuerpo (por ejemplo, en gramos, miligramos o microgramos) o como una relación de masa de anticuerpo con respecto a la masa corporal (por ejemplo, como gramos por kilogramo (g/kg), miligramos por kilogramo (mg/kg), o microgramos por kilogramo (µg/kg)). Una dosis eficaz de anticuerpo usada en los presentes procedimientos oscilará, por ejemplo, entre 1 µg/kg y 500 mg/kg. Un intervalo a modo de ejemplo para dosis eficaces de anticuerpos usadas en los procedimientos de la presente invención es entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg. Dosis eficaces a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 10 µg/kg, 30 µg/kg, 100 µg/kg, 300 µg/kg, 1 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg.

Como se usa en el presente documento, el término “administrar” se refiere al acto de introducir un agente farmacéutico en un cuerpo del sujeto. Una vía de administración a modo de ejemplo es la vía parenteral, por ejemplo, administración subcutánea, intravenosa o intraperitoneal.

Los términos “paciente” incluyen ser humano y otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento terapéutico con uno o más agentes (por ejemplo, agentes inmunoterapéuticos) de la invención. Los pacientes a modo de ejemplo reciben tratamiento terapéutico con los agentes inmunoterapéuticos de la invención.

El término “modelo animal” o “animal de modelo”, como se usa en el presente documento, incluye un miembro de una especie de mamífero tal como roedores, primates no humanos, ovejas, perros y vacas que presentan rasgos o características de un cierto sistema de enfermedad o trastorno, por ejemplo, un sistema humano, enfermedad o trastorno. Animales no humanos a modo de ejemplo seleccionados de la familia de los roedores incluyen conejos, cobayas, ratas y ratones, lo más preferentemente ratones. Un “modelo animal” de, o “animal de modelo” que tiene un trastorno de demencia presenta, por ejemplo, déficits cognitivos importantes asociados a un trastorno relacionado con la demencia (por ejemplo, EA). Preferentemente, el animal de modelo presenta un empeoramiento progresivo del déficit cognitivo a medida que aumenta la edad, de forma que la progresión de la enfermedad en el animal modelo es paralela a la progresión de la enfermedad en un sujeto que padece el trastorno de demencia.

El término “reactivo inmunológico” se refiere a un agente que comprende o consiste en una o más inmunoglobulinas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o cadenas de anticuerpos, como se define en el presente documento, o combinaciones de los mismos. El término “agente inmunológico” también incluye ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o cadenas de anticuerpos. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina está normalmente ligado a elementos reguladores, tales como un promotor y potenciador, que permiten la expresión del ácido nucleico en una célula o tejido apropiado.

El término “reactivo inmunológico de 12A11” se refiere a un reactivo inmunológico que tiene una o más características del anticuerpo monoclonal 12A11, como se describe en el presente documento. Características del anticuerpo monoclonal 12A11 incluyen, sin limitación, unión específica a péptido Aβ, unión preferencial por Aβ oligomérico soluble, la capacidad para reducir la carga de placas asociada a trastornos amiloidogénicos en un sujeto y mejorar la cognición en un modelo animal de EA. En ciertos aspectos, los reactivos inmunológicos de 12A11 tienen restos estructurales conservados con el anticuerpo monoclonal 12A11, por ejemplo, dominios de unión a antígeno conservados o regiones (por ejemplo, una o más CDR de 12A11) como se describe en el presente documento. Reactivos inmunológicos de 12A11 a modo de ejemplo incluyen anticuerpos 12A11, anticuerpos 12A1 humanizados, anticuerpos 12A11 quiméricos, anticuerpos 12A11 monocatenarios, anticuerpos 12A11 biespecíficos, fragmentos de anticuerpos 12A11, cadenas de anticuerpos 12A11, variantes de los mismos (por ejemplo, variantes de anticuerpos 12A11 madurados por afinidad y variantes de anticuerpos Fc 12A11), o combinaciones de los mismos. El término

reactivo inmunológico de 12A11 también incluye cualquier anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, anticuerpo monocatenario, anticuerpo biespecífico), fragmento de anticuerpo, o cadena de anticuerpo que comprende al menos un dominio, región o fragmento derivado de un anticuerpo 12A11, fragmento de anticuerpo 12A11 o cadena de anticuerpo 12A11.

El término “reactivo inmunoterapéutico” se refiere a un reactivo inmunológico adecuado para uso terapéutico.

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. Se pretende que el término “anticuerpo” englobe cualquier clase de Ig o cualquier subclase de Ig (por ejemplo, la subclase IgG₁, IgG₂, IgG₃ y IgG₄ de IgG) obtenida a partir de cualquier fuente (por ejemplo, en realizaciones a modo de ejemplo, seres humanos y primates no humanos, y en realizaciones adicionales, roedores, lagomorfos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos, etc.).

El término “clase de Ig” o “clase de inmunoglobulina”, como se usa en el presente documento, se refiere a las cinco clases de inmunoglobulina que se han identificado en seres humanos y mamíferos superiores, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El término “subclase de Ig” se refiere a las dos subclases de IgM (H y L), tres subclases de IgA (IgA₁, IgA₂ e IgA secretora), y cuatro subclases de IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) que se han identificado en seres humanos y mamíferos superiores.

El término “subclase de IgG” se refiere a las cuatro subclases de la clase de inmunoglobulina IgG - IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ que se han identificado en seres humanos y mamíferos superiores por las cadenas pesadas γ de las inmunoglobulinas, γ_1 - γ_4 , respectivamente.

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.

Como se usa en el presente documento, el término “sitio de unión a antígeno” se refiere a un sitio que se une específicamente a (inmunoreacciona con) un antígeno (por ejemplo, un antígeno de superficie celular o soluble). Los anticuerpos de la invención comprenden preferentemente al menos dos sitios de unión a antígeno. Un sitio de unión a antígeno comúnmente incluye CDR de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina y el sitio de unión formado por estas CDR determina la especificidad del anticuerpo. Una “región de unión a antígeno” o “dominio de unión a antígeno” es una región o dominio (por ejemplo, una región o dominio de anticuerpo que incluye un sitio de unión a anticuerpo como se define arriba).

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). 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).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de una población clónica de células productoras de anticuerpos (por ejemplo, linfocitos B o células B) que es homogénea en estructura y especificidad por antígenos. El término "anticuerpo policlonal" se refiere a una pluralidad de anticuerpos que se originan a partir de diferentes poblaciones clónicas de células productoras de anticuerpos que son heterogéneas en su estructura y especificidad por epítipo, pero que reconocen un antígeno común. Los anticuerpos monoclonales y policlonales pueden existir dentro de fluidos corporales, como preparaciones en bruto o pueden purificarse, como se describe en el presente documento.

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 una 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 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. 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.

Una "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" englobado por esta divulgación puede prepararse usando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento o aquellos que son muy conocidos en la técnica.

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%, el 90-95% o el 95-99% de identidad (es decir, identidad de secuencias local) con la secuencia de región estructural o 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 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 "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.

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.).

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 "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. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones 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 (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.

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 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. 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

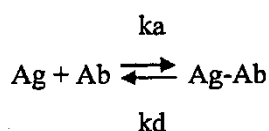
(es decir, comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden residuos de CDR donantes y residuos de la región estructural aceptores) no encontrados en inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el presente documento.

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 un antígeno o epítipo particular y, generalmente, no presenta reactividad cruzada significativa. En realizaciones a modo de ejemplo, el anticuerpo no presenta reactividad cruzada (por ejemplo, no reacciona de forma cruzada con péptidos no Aβ o con epítopos remotos sobre Aβ). 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 Aβ se unirá apreciablemente a Aβ, pero no reaccionará significativamente con proteínas o péptidos no Aβ (por ejemplo, proteínas o péptidos no Aβ incluidos en placas). Por ejemplo, un anticuerpo específico para un epítipo particular 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.

Como se usa en el presente documento, el término “afinidad” se refiere a la fuerza de la unión de un sitio de combinación con un único antígeno con un determinante antigénico. La afinidad depende de la proximidad del ajuste estereoquímico entre los sitios de combinación con anticuerpo y los determinantes del antígeno, del tamaño del área de contacto entre ellos, de la distribución de grupos cargados e hidrófobos, etc. La afinidad del anticuerpo puede medirse por diálisis en equilibrio o por el procedimiento cinético BIACORE™. El procedimiento BIACORE™ se basa en el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales (SPR), que se produce cuando las ondas de plasmones superficiales se excitan en una interfase metal/líquido. La luz se dirige a, y se refleja de, el lado de la superficie no en contacto con la muestra, y la SPR produce una reducción en la intensidad de luz reflejada a una combinación específica de ángulo y longitud de onda. Los eventos de unión bimoleculares producen cambios en el índice de refracción en la capa superficial, que se detectan como cambios en la señal de SPR.

La constante de disociación, KD, y la constante de asociación, KA, son medidas cuantitativas de la afinidad. En equilibrio, el antígeno libre (Ag) y el anticuerpo libre (Ab) están en equilibrio con el complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ab), y las constantes de velocidad, ka y kd, cuantifican las tasas de las reacciones individuales:



En equilibrio, $k_a [\text{Ab}] [\text{Ag}] = k_d [\text{Ag-Ab}]$. La constante de disociación, KD, se facilita por: $KD = k_d/k_a = [\text{Ag}] [\text{Ab}] / [\text{Ag-Ab}]$. KD tiene unidades de concentración, lo más normalmente M, mM, μM, nM, pM, etc. Cuando se comparan afinidades de anticuerpos expresadas como KD, los que tienen mayor afinidad por Aβ se indican por un valor inferior. La constante de asociación, KA, se facilita por: $KA = KA/KD = [\text{Ag-Ab}] / [\text{Ag}] [\text{Ab}]$. KA tiene unidades de concentración inversa, lo más normalmente M⁻¹, mM⁻¹, μM⁻¹, nM⁻¹, pM⁻¹, etc. Como se usa en el presente documento, el término “avidez” se refiere a la fuerza del enlace antígeno-anticuerpo después de la formación de complejos reversibles.

El término “variante de inmunoglobulina Fc” o “variante de anticuerpo Fc” incluye inmunoglobulinas o anticuerpos (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de anticuerpos, etc.) que tienen una región Fc alterada. Las regiones Fc pueden alterarse, por ejemplo, de forma que la inmunoglobulina tenga una función efectora alterada. Una alteración de aminoácidos incluye una sustitución de aminoácidos, adición, delección y/o modificación de uno o más aminoácidos de una inmunoglobulina, por ejemplo, en la región Fc de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención incluyen una o más mutaciones en la región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc incluye una o más alteraciones de aminoácidos en la región bisagra, por ejemplo, en las posiciones EU 234, 235, 236 y/o 237. Los anticuerpos que incluyen mutaciones en la región bisagra en una o más de las posiciones de aminoácidos 234, 235, 236 y/o 237 pueden prepararse como se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.624.821 y la patente de EE.UU. nº 5.648.260.

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.

5 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.

10 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.

15 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 humana.

20 El término anticuerpo “aglicosilado” se refiere a un anticuerpo que carece de uno o más hidratos de carbono en virtud de un procedimiento químico o enzimático, mutación de uno o más sitios de glucosilación, expresión en bacterias, etc. Un anticuerpo aglicosilado puede ser un anticuerpo desglucosilado, que es un anticuerpo para el que se ha eliminado el hidrato de carbono de Fc, por ejemplo, químicamente o enzimáticamente. Alternativamente, el anticuerpo aglicosilado puede ser un anticuerpo no glucosilado o sin glucosilar, que es un anticuerpo que se expresó sin hidrato de carbono de Fc, por ejemplo, por mutación de uno o más residuos que codifican el patrón de glucosilación o por expresión en un organismo que no une hidratos de carbono a proteínas, por ejemplo, bacterias.

25 “Numeración de Kabat”, a menos que se establezca de otro modo, es como se enseña en Kabat y col. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). “Numeración EU”, a menos que se establezca de otro modo, también se enseña en Kabat y col. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y, por ejemplo, se refiere a la numeración de los residuos en secuencias de anticuerpos de la cadena pesada usando el índice EU como se describe allí. Este sistema de numeración se basa en la secuencia del anticuerpo Eu descrita en Edelman y col., 63(1):78-85 (1969).

30 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. Otros receptores de Fc incluyen los receptores de Fc neonatales (FcRn) que regulan la semivida de los anticuerpos. 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).

35 Un “antígeno” es una entidad (por ejemplo, una entidad o péptido proteínico) con el que una inmunoglobulina o anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) se une específicamente.

40 El término “epítipo” 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 epítipo 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, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

45 Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo 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 Aβ. 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 Stahl 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

5 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.

10 Un epítipo también es reconocido por células inmunológicas, por ejemplo, linfocitos B y/o linfocitos T. El reconocimiento celular de un epítipo puede determinarse por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se 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).

15 Epítopos o determinantes antigénicos a modo de ejemplo a los que un anticuerpo de la invención se une pueden encontrarse dentro de la proteína precursora de amiloide (APP) humana, pero se encuentran preferentemente dentro del péptido Aβ de APP. Epítopos o determinantes antigénicos a modo de ejemplo dentro de Aβ, como se describe en el presente documento, se localizan dentro del extremo N, región central o extremo C de Aβ.

20 Un "epítipo del extremo N" es un epítipo o determinante antigénico que comprende residuos localizados dentro del extremo N del péptido Aβ. Epítopos del extremo N a modo de ejemplo incluyen residuos dentro de los aminoácidos 1-10 ó 1-12 de Aβ, preferentemente de los residuos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-6, 3-6 ó 3-7 de Aβ42. Otros epítopos del extremo N a modo de ejemplo empiezan en los residuos 1-3 y terminan en los residuos 7-11 de Aβ. Epítopos del extremo N a modo de ejemplo adicionales incluyen los residuos 2-4, 5, 6, 7 u 8 de Aβ, los residuos 3-5, 6, 7, 8 ó 9 de

25 Aβ o los residuos 4-7, 8, 9 ó 10 de Aβ42.

"Epítopos centrales" son epítopos o determinantes antigénicos que comprenden residuos localizados dentro de la porción central o media del péptido Aβ. Epítopos centrales a modo de ejemplo incluyen residuos dentro de los aminoácidos 13-38, preferentemente dentro de 16-21, 16-22, 16-23, 16-24, 18-21, 19-21, 19-22, 19-23 ó 19-24 del

30 péptido Aβ.

"Epítopos del extremo C" son epítopos o determinantes antigénicos que comprenden residuos localizados dentro del extremo C del péptido Aβ (por ejemplo, dentro de aproximadamente los aminoácidos 30-40 ó 30-42 de Aβ). Epítopos o determinantes antigénicos a modo de ejemplo adicionales incluyen los residuos 33-40 ó 33-42 de Aβ. Tales epítopos pueden denominarse "epítopos del extremo C".

35

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 en este ejemplo). Un anticuerpo tal no se pone necesariamente en contacto con cualquier

40 residuo dentro de 3-7 de Aβ. Ni ninguna sustitución única de aminoácidos ni delección dentro de 3-7 de Aβ afecta necesariamente significativamente la afinidad de unión.

Los términos "anticuerpo para Aβ" y "anti-Aβ" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que se une a uno o más epítopos o determinantes antigénicos dentro de la proteína Aβ. Anticuerpos para

45 Aβ a modo de ejemplo incluyen anticuerpos para Aβ del extremo N, anticuerpos para Aβ centrales y anticuerpos para Aβ del extremo C. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo para Aβ del extremo N" debe referirse a un anticuerpo para Aβ que reconoce al menos un epítipo o determinante antigénico del extremo N. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo para Aβ central" debe referirse a un anticuerpo para Aβ que reconoce al menos un epítipo o determinante antigénico central. Como se usa en el presente documento, el término

50 "anticuerpo para Aβ del extremo C" debe referirse a un anticuerpo para Aβ que reconoce al menos un epítipo o determinante antigénico del extremo C.

El término respuesta "inmunológica" o "inmune" es el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) y/o celular (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra un

55 antígeno en un sujeto. Una respuesta tal puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo o células T sensibilizadas. Una respuesta inmunitaria celular es provocada por la presentación de epítopos de polipéptido en asociación con moléculas de MHC de clase I o clase II para activar linfocitos auxiliares CD4⁺ T específicos de antígeno y/o linfocitos T citotóxicos CD8⁺. La respuesta puede también implicar activación de monocitos, macrófagos, células citolíticas espontáneas ("NK"), basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de la microglía, eosinófilos u otros

60 componentes de inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por célula puede determinarse por ensayos de proliferación (linfocitos T CD4⁺) o ensayos de CTL (linfocito T citotóxico) (véase Burke, REF; Tigges, REF). Las contribuciones relativas de respuestas humorales y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno pueden distinguirse aislando por separado anticuerpos y linfocitos T de un animal

65 inmunizado o individuo y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término “inmunoterapia” se refiere a un tratamiento, por ejemplo, un tratamiento terapéutico o profiláctico, de una enfermedad o trastorno previsto para y/o que produce una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria activa o pasiva).

- 5 Un “agente inmunogénico” o “inmunógeno” puede inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo en la administración a un mamífero, opcionalmente conjuntamente con un adyuvante. Una “composición inmunogénica” es una que comprende un agente inmunogénico.

10 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.

15 Como se usa en el presente documento, el término “kit” se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales que facilitan el análisis de muestras. En algunas realizaciones, el kit de inmunoensayo de la presente invención incluye un antígeno adecuado, aglutinante que comprende un resto detectable y reactivos de detección. Un sistema para amplificar la señal producida por restos detectables puede o puede no incluirse en el kit. Además, en otras realizaciones, el kit incluye, pero no se limita a, componentes tales como aparato para la recogida de muestras, tubos de muestra, recipientes, bandejas, gradillas, discos, placas, instrucciones para el usuario del kit, disoluciones u otros reactivos químicos, y muestras que van a usarse para la estandarización, normalización y/o muestras de control.

25 Diversas metodologías usadas en la presente invención incluyen una etapa que implica comparar un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. con un “control adecuado”, denominado indistintamente en el presente documento un “control apropiado”. Un “control adecuado” o “control apropiado” es cualquier control o patrón familiar para un experto habitual en la materia útil para fines de comparación. En una realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc., determinado antes de realizar una metodología de la invención, como se describe en el presente documento. En otra realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc., determinado en un sujeto, por ejemplo, un sujeto de control o normal que presenta, por ejemplo, rasgos normales. En otra realización más, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor predefinido, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc.

II. Reactivos inmunológicos y terapéuticos

35 Los reactivos inmunológicos y terapéuticos usados en la invención comprenden o consisten en inmunógenos o anticuerpos, o fragmentos funcionales o de unión a antígeno de los mismos, 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 responsables del reconocimiento de antígeno. La porción del extremo carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

45 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, tres 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).

50 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).

55 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.

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.

A. Anticuerpos para A β

Los agentes terapéuticos de la invención son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a A β o a otros componentes de la placa de amiloide. Anticuerpos preferidos son anticuerpos monoclonales. Algunos de tales anticuerpos se unen específicamente a la forma agregada de A β sin unirse a la forma soluble. Algunos se unen específicamente a la forma soluble sin unirse a la forma agregada. Algunos se unen a tanto las formas agregadas como solubles. Algunos anticuerpos se unen a A β en placas. Algunos anticuerpos pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Algunos anticuerpos pueden reducir la carga de amiloide en un sujeto. Algunos anticuerpos pueden reducir la distrofia neurítica en un sujeto. Algunos anticuerpos pueden mantener la arquitectura sináptica (por ejemplo, sinaptofisina). Algunos anticuerpos pueden neutralizar una o más neuroformas activas de A β . En una realización preferida, anticuerpos de la invención para su uso en inmunoterapia pasiva se unen a péptido A β soluble que incluye polipéptido A β soluble monomérico y/o soluble oligomérico (por ejemplo, dímeros, trímeros solubles de A β , y similares).

En una realización de la invención, el anticuerpo puede unirse a A β agregado o insoluble depositado en placas para reducir el tamaño o densidad de placas de amiloide. En otra realización, el anticuerpo puede capturar A β soluble, que incluye polipéptido A β soluble monomérico, además de soluble oligomérico (por ejemplo, dímeros, trímeros solubles de A β y similares), y prevenir la acumulación de A β y/o promover la eliminación de A β del SNC. En una realización particularmente preferida, los anticuerpos de la invención pueden unirse a tanto péptidos A β solubles como insolubles o fragmentos de los mismos, y pueden prevenir la formación de placa de amiloide adicional mientras que también disminuyen el tamaño y densidad de placas de amiloide existentes.

Los anticuerpos usados en procedimientos terapéuticos preferentemente tienen una región constante intacta o al menos suficiente de la región constante para interactuar con un receptor de Fc. 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 IgG1 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 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ó 10^{10} M⁻¹ (incluyendo afinidades intermedias de estos valores).

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen aquellos anticuerpos que pueden unirse y/o eliminar A β soluble en el SNC o cerebro de un sujeto. Anticuerpos a modo de ejemplo también incluyen aquellos anticuerpos que pueden capturar A β soluble, por ejemplo, en la circulación sanguínea de un sujeto. Anticuerpos preferidos pueden mejorar rápidamente la cognición en un sujeto, por ejemplo, mediante eliminación y/o captura de A β soluble.

Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo específico dentro de A β que puede ser un epítipo conformacional o no conformacional. La eficacia profiláctica y terapéutica de los anticuerpos puede probarse usando los procedimientos del modelo de animal transgénico descritos en los ejemplos. Los anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de A β (designándose 1 el primer residuo del extremo N de A β natural), más preferentemente a un epítipo dentro de los residuos 3-7 de A β . En algunos procedimientos se usan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por diferentes epítopes, por ejemplo, un anticuerpo específico para un epítipo dentro de los residuos 3-7 de A β puede co-administrarse con un anticuerpo específico para un epítipo 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 epítipo 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 epítipo unido por el anticuerpo. Los anticuerpos también pueden probarse para especificidad por epítipo en un ensayo de competencia con un anticuerpo cuya especificidad por epítipo ya se ha determinado. Por ejemplo, los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 12A11 para unirse a A β se unen con el mismo epítipo o epítipo similar como 12A11, es decir, dentro de los residuos 3-7 de A β . El cribado de anticuerpos para la especificidad por epítipo es un factor pronóstico útil de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha determinado que se une a un epítipo 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 de amiloide. 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 los epítopes de A β preferidos de la invención. Tales anticuerpos pueden usarse en la formulación de diversas composiciones terapéuticas de la invención o, preferentemente, proporcionan regiones determinantes de 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, arriba. 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 μ g de A β 1-42, más adyuvante completo/incompleto de Freund (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 A β en un ratón, preparando hibridomas y cribando los hibridomas para un anticuerpo que se une específicamente a A β . Opcionalmente, los anticuerpos se criban para unirse a una región específica o fragmento deseado de A β sin unirse a otros fragmentos no solapantes de A β . El último cribado puede llevarse a cabo determinando la unión de un anticuerpo a una colección de mutantes de delección de un péptido A β 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 A β . Si los anticuerpos de prueba y de referencia compiten, entonces se unen al mismo epítipo o epítopes 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. Los isotipos humanos IgG1 e IgG4 son a modo de ejemplo. 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. 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) interaccione 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.

5 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.

10 Las CDR y regiones estructurales son como se definen por Kabat y col. o Chothia y col., arriba. Cuando los residuos de la región estructural, como se definen por Kabat y col., arriba, constituyen residuos de bucles estructurales como se define por Chothia y col., arriba, 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
15 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 interaccionen 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) y puede desearse
20 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
25 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
30 aminoácidos puede seleccionarse el aminoácido de la inmunoglobulina donante en vez del aminoácido de la inmunoglobulina aceptora. 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.

35 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 interactuar. 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
40 los 8 últimos aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada como parte de las CDR, debido a que desde el punto de vista de la estructura estos 8 aminoácidos se comportan más como parte de la región estructural.

Los aminoácidos que pueden interactuar con aminoácidos en las CDR pueden identificarse de otra forma más. El
45 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
50 puede calcularse basándose en un modelo tridimensional de un anticuerpo, usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) y Lee y Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971). Los aminoácidos de la región estructural también pueden interactuar 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.

55 Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en la región estructural son importantes para determinar la confirmación de CDR (por ejemplo, que pueden interactuar con CDR) en muchos anticuerpos (Chothia y Lesk, arriba, Chothia y col., arriba y Tramontano y col., J. Mol. Biol. 215:175 (1990). Estos autores identificaron residuos de la región estructural conservados importantes para la conformación de CDR por análisis de las estructuras de varios anticuerpos conocidos. Los anticuerpos analizados se clasificaron en un número limitado de clases estructurales o
60 “canónicas” basándose en la conformación de las CDR. Los residuos de la región estructural conservados dentro de los miembros de una clase canónica se denominan residuos “canónicos”. Los residuos canónicos incluyen los residuos 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 y 95 de la cadena ligera y los residuos 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 y 94 de la cadena pesada. Residuos adicionales (por ejemplo, residuos determinantes de la estructura de CDR) pueden identificarse según la metodología de Martin y Thorton (1996) J. Mol. Biol. 263:800. Notablemente se sabe que los
65 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 interactuar 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. Residuos adicionales que pueden efectuar la conformación de las CDR pueden identificarse según la metodología de Foote y Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487. Tales residuos se denominan residuos de “vernier” y son aquellos residuos en la región estructural estrechamente subyacente (es decir, que forman una “plataforma” bajo) las CDR. En todas estas

posiciones enumeradas se prefiere la elección del aminoácido donante en vez del aminoácido aceptor (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 compactación” 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., arriba. Generalmente, residuos de compactación raros deberían ser retenidos en el anticuerpo humanizado si se diferencian de aquellos en las regiones estructurales humanas.

En general, pueden sustituirse uno o más de los aminoácidos que satisfacen los criterios anteriores. 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.

Normalmente, las regiones CDR en anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas, y más normalmente, idénticas a las regiones CDR correspondientes del anticuerpo donante. Sin embargo, en ciertas realizaciones, puede desearse modificar una o más CDR regiones para modificar la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Normalmente, uno o más residuos de una CDR se alteran para modificar la unión para lograr una constante de asociación más favorecida de la unión, una constante de disociación más favorecida de la unión, o ambas, de forma que se logre una constante de unión idealizada. Usando esta estrategia puede lograrse un anticuerpo que tiene afinidad de unión ultra-alta de, por ejemplo, 10^{10} M^{-1} o más. Brevemente, se denomina secuencia de CDR donante a una secuencia de bases de la que uno o más residuos están entonces alterados. Las técnicas de maduración por afinidad, como se describe en el presente documento, pueden usarse para alterar la región (regiones) CDR, seguido de cribado de las moléculas de unión resultantes para el cambio deseado en la unión. El procedimiento también puede usarse para alterar la CDR donante, normalmente una CDR de ratón, para ser menos inmunogénica de forma que se minimice o evita una posible respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA). Por consiguiente, como la(s) CDR(s) está(n) alterada(s), los cambios en la afinidad de unión, además de la inmunogenicidad, pueden monitorizarse y puntuarse de forma que se consiga un anticuerpo optimizado para la mejor unión combinada y baja inmunogenicidad (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.656.467 y la publicación de patente de EE.UU. US20020164326A1).

En otro enfoque, las regiones CDR del anticuerpo se analizan para determinar las contribuciones de cada CDR individual a la unión a anticuerpo y/o inmunogenicidad sustituyendo sistemáticamente cada una de las CDR donantes con un homólogo humano. El panel resultante de anticuerpos humanizados se puntúa entonces para la afinidad por antígeno y posible inmunogenicidad de cada CDR. De esta forma se determinan las dos propiedades clínicamente importantes de una molécula de unión candidata, es decir, unión a antígeno y baja inmunogenicidad. Si los sueros del paciente contra una forma murina o injertada en CDR (humanizada) correspondiente del anticuerpo están disponibles, entonces el panel de anticuerpos completo que representa los intercambios de la CDR humana sistemática puede cribarse para determinar la respuesta antiidiotípica de pacientes contra cada CDR donante (para detalles técnicos véase, por ejemplo, Iwashii y col., Mol. Immunol. 36:1079-91 (1999)). Un enfoque tal permite identificar regiones CDR donantes esenciales a partir de CDR donantes no esenciales. Las regiones CDR donantes no esenciales pueden entonces intercambiarse con una CDR homóloga humana. Si una región CDR esencial no puede intercambiarse sin pérdida de función inaceptable, la identificación de los residuos determinantes de la especificidad (SDR) de la CDR se realiza, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio. De esta forma, la CDR puede entonces remanipularse para retener solo las SDR y ser humana y/o mínimamente inmunogénica en las restantes posiciones de aminoácidos a lo largo de la CDR. Tal enfoque, en el que solo una parte de la CDR donante se injerta, también se denomina injerto de CDR abreviada (para detalles técnicos de las técnicas anteriores véase, por ejemplo, Tamura y col., J. of Immunology 164(3):1432-41. (2000); Gonzales y col., Mol. Immunol 40:337-349 (2003); Kashmiri y col., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 38:3-16 (2001); y De Pascalis y col., J. of Immunology 169(6):3076-84. (2002).

Además, 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.

Candidatos adicionales para la sustitución son aminoácidos de la región estructural humana aceptora que son “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. Si un residuo es raro o no para secuencias de la región estructural humana aceptora también debe considerarse cuando se seleccionan residuos para retromutación basándose en la contribución a la conformación de CDR. Por ejemplo, si la retromutación produce la sustitución de un residuo que es raro para secuencias de la región estructural humana aceptora, un anticuerpo humanizado puede probarse para con y sin actividad. Si la retromutación no es necesaria para la actividad, puede eliminarse para reducir las cuestiones de inmunogenicidad. Por ejemplo, la retromutación en los siguientes residuos puede introducir un residuo que es raro en secuencias de la región estructural humana aceptora; vl= V2(2,0%), L3 (0,4%), T7 (1,8%), Q18 (0,2%), L83 (1,2%), I85 (2,9%), A100 (0,3%) y L106 (1,1%); y vh=T3 (2,0%), K5 (1,8%), I11 (0,2%), S23 (1,5%), F24 (1,5%), S41 (2,3%), K71 (2,4%), R75 (1,4%), I82 (1,4%), D83 (2,2%) y L109 (0,8%). Estos criterios ayudan a 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 aceptor humano raro 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 menos de aproximadamente el 20%, preferentemente menos de aproximadamente el 10%, más preferentemente menos de aproximadamente el 5%, incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 3%, incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 2% e incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 1% de secuencias en una muestra representativa de secuencias, 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, cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es o no “raro” o “común”, frecuentemente se considerarán preferiblemente solo las secuencias variables humanas, y cuando se decide si un aminoácido de ratón es “raro” o “común”, solo secuencias de la región variable de ratón. Además, 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., arriba). 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.

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., arriba. 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.

Candidatos adicionales para la sustitución son residuos de la región estructural aceptores que se corresponden con un residuo de la región estructural donante raro. Residuos de la región estructural donantes raros son aquellos que son raros (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 raros que se predice que afectan la unión (por ejemplo, residuos canónicos de compactación y/o de vernier) son retenidos, mientras que los residuos que se predice que no son importantes para la unión pueden estar sustituidos. Residuos raros dentro de la secuencia vl de 12A11 incluyen I85 (3,6%). Residuos raros dentro de la secuencia vh de 12A11 incluyen T3 (1,0%), I11 (1,7%), L12 (1,7%), S41 (2,8%), D83 (1,8%) y A85 (1,8%).

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 anticuerpo aceptor (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.

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.

En realizaciones a modo de ejemplo, los anticuerpos humanizados de la invención presentan una afinidad de unión específica por antígeno de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 ó 10^{10} M⁻¹. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden tener afinidades de unión de al menos 10^{10} , 10^{11} ó 10^{12} 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 FR aceptoras, 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.

En una realización, los anticuerpos humanizados de la invención incluyen una secuencia de la región estructural de la región variable seleccionada de genes de anticuerpo humano (por ejemplo, segmentos de genes de anticuerpos de la línea germinal) que incluyen uno o más tipos de estructura de CDR canónica que son idénticos o similares a los tipos de estructura de CDR canónica para el anticuerpo no humano correspondiente (por ejemplo, murino) que está humanizado. Véase la patente de EE.UU. n° 6.881.557 y Tan y col., Journal of Immunol 169:1119-1125 (2002)).

También se caracterizan anticuerpos humanizados que comprenden una región estructural que tiene una secuencia de aminoácidos consenso, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.300.064. La siguiente tabla enumera diversas secuencias consenso que pueden usarse como regiones estructurales en los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento. Por tanto, una cualquiera de las secuencias consenso mostradas más adelante puede usarse en combinación con una o más CDR descritas en el presente documento, produciendo así una inmunoglobulina humanizada o anticuerpo humanizado de la invención.

Consenso de secuencias para regiones de estructura de cadenas ligeras	Secuencia de Aminoácidos (SEC IQ NO.)
Cadena Kappa	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO:38)
Cadena Kappa	DIVMTQSPPLSLPVTGPESISCRSSQSLHNSNGYNLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO:39)
Cadena Kappa	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO:40)
Cadena Kappa	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO:41)
Cadena Lambda	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQQHYTTPPVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO:42)

(Continúa)

Consenso de secuencias para regiones de estructura de cadenas ligeras	Secuencia de Aminoácidos (SEC IQ NO.)
Cadena Lambda	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQQHYTTPPV FGGGTKLTVLG (SEQ ID NO:43)
Cadena Lambda	SYELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKP GQAPVLVIYDDSDRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQQHYTTPPVFGG GTKLTVLG (SEQ ID NO:45)
Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR WGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:46)
Cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVW RQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDT SISTAYMELSSLRSEDNAVYYCARWGGDGFYAMDYWG QGTLLTVSS (SEQ ID NO:47)
Cadena pesada	QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIR QPPGKALEWLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQ VVLTMNMDPVDATYYCARWGGDGFYAMDYWGQG TLTVSS (SEQ ID NO:48)
Cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDNAVYYCARWGGDGFYAMDYWGQG TLTVSS (SEQ ID NO:49)
Cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP PGKGLEWIGYIYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADNAVYYCARWGGDGFYAMDYWGQGTLLT VSS (SEQ ID NO:50)
Cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDS TRYSPSFQGGVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCARWGGDGFYAMDYWGQGTLL TVSS (SEQ ID NO:51)
Cadena pesada	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWI RQSPGRGLEWLGRTYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDT SKNQFSLQLNSVTPEDNAVYYCARWGGDGFYAMDYWG QGTLLTVSS (SEQ ID NO:52)

Todavía otra estrategia que puede usarse para producir los anticuerpos humanizados de la invención es para seleccionar la secuencia de la línea germinal humana más próxima como la región estructural que recibe las CDR de un anticuerpo murino que va a humanizarse. Véase, Mercken y col., documento US 2005/0129695. Las secuencias de la línea germinal se originan a partir de genes de inmunoglobulina sin reordenar y por tanto no presentan hipermutación somática que es potencialmente inmunógena. Este enfoque se basa en la búsqueda de la secuencia de la línea germinal humana más próxima. En particular, los dominios variables de secuencias de la línea germinal que presentan un alto grado de identidad de secuencias con las regiones estructurales VL y VH murinas pueden identificarse usando las bases de datos V-Base y/o IMGT (públicamente accesibles mediante el servidor de internet de Medical Research Council Center for Protein Engineering y el servidor de internet del Instituto europeo de Bioinformática, respectivamente). Las CDR murinas se injertan entonces sobre secuencias aceptoras de la región variable humana de la línea germinal elegida.

Técnicas de humanización a modo de ejemplo adicionales que pueden usarse para humanizar las inmunoglobulinas

de la invención se describen en, por ejemplo, Presta y col., J. Immunol., 151: 2623-2632 (1993); Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89: 4285-4289 (1992); Couto y col., Cancer Res., 55: 5973s-77s (1995); O'Conner y col., Protein Eng., 11: 321-328 (1998); y Antibody Engineering-Methods and Protocols por Lo, vol. 248 (2004).

- 5 Adicionalmente, los residuos de la región estructural pueden analizarse usando cualquiera de las técnicas que se han descrito anteriormente para determinar qué residuo, si alguno, debe estar sustituido para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. Por ejemplo, puede usarse modelado informático para identificar residuos que tienen una buena probabilidad de influir directamente o indirectamente en la unión a antígeno.

10 c. Producción de anticuerpos 12A11 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 el anticuerpo monoclonal 12A11. 12A11 es específico para el extremo N de A β y se ha mostrado que (1) tiene una alta avidéz por A β 1-42 agregada, (2) tiene la capacidad de capturar A β soluble, y (3) media en la fagocitosis (por ejemplo, induce fagocitosis) de placa de amiloide (véase el Ejemplo I). La eficacia *in vivo* del anticuerpo 12A11 se describe en el Ejemplo II. La clonación y secuenciación de ADNc que codifica las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 12A11 se describen en el Ejemplo III.

Secuencias de anticuerpos aceptores humanos adecuadas pueden identificarse 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 identifican por consulta, por ejemplo, de la base de datos de Kabat o la base de datos de secuencias de proteínas de IgG usando BLAST de IgG 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 secuencias aceptoras que comparten más del 50% de identidad de secuencias con secuencias donantes murinas, por ejemplo, secuencias de la región estructural donante (FR). Preferentemente se seleccionan las secuencias de anticuerpos aceptoras que comparten el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de identidad de secuencias o más.

Una comparación informática de 12A11 reveló que la cadena ligera de 12A11 (subgrupo II de ratón) muestra la mayor identidad de secuencias con cadenas ligeras humanas del subtipo kappa II, y que la cadena pesada de 12A11 (subgrupo Ib de ratón) muestra la mayor identidad de secuencias con cadenas pesadas humanas del subtipo II, como se define por Kabat y col., arriba. Las regiones estructurales humanas ligeras y pesadas pueden derivarse de anticuerpos humanos de estos subtipos, o de secuencias consenso de tales subtipos. En un primer esfuerzo de humanización, las regiones estructurales variables de la cadena ligera se derivaron de anticuerpos del subgrupo II humano. Basándose en experimentos previos diseñados para lograr altos niveles de expresión de anticuerpos humanizados que tienen regiones estructurales variables de la cadena pesada derivadas de anticuerpos del subgrupo II humano, se había descubierto que los niveles de expresión de tales anticuerpos eran algunas veces bajos. Por consiguiente, basándose en el razonamiento descrito en Saldanha y col. (1999) Mol Immunol. 36:709-19, se eligieron las regiones estructurales de anticuerpos del subgrupo III humano en vez del subgrupo II humano.

Un anticuerpo del subgrupo II humano K64 (AIMS4) (nº de acceso BAC01733) se identificó de la base de datos no redundante NCBI que tiene identidad de secuencias significativa dentro de las regiones variables de la cadena ligera de 12A11. Un anticuerpo del subgrupo III humano M72 (nº de acceso AAA69734) se identificó de la base de datos no redundante NCBI que tiene identidad de secuencias significativa dentro de las regiones variables de la cadena pesada de 12A11 (véase también Schroeder y Wang (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6146-6150).

Secuencias aceptoras de cadena ligera alternativas incluyen, por ejemplo, nº de acceso de PDB 1KFA (gi24158782), nº de acceso de PDB 1KFA (gi24158784), nº de acceso de EMBL CAE75574.1 (gi38522587), nº de acceso de EMBL CAE75575.1 (gi38522590), nº de acceso de EMBL CAE84952.1 (gi39838891), nº de acceso de DJB BAC01734.1 (gi21669419), nº de acceso de DJB BAC01730.1 (gi21669411), nº de acceso de PIR S40312 (gi481978), nº de acceso de EMBL CAA51090.1 (gi3980118), nº de acceso de GenBank AAH63599.1 (gi39794308), nº de acceso de PIR S22902 (gi106540), nº de acceso de PIR S42611 (gi631215), nº de acceso de EMBL CAA38072.1 (gi433890), nº de acceso de GenBank AAD00856.1 (gi4100384), nº de acceso de EMBL CAA39072.1 (gi34000), nº de acceso de PIR S23230 (gi284256), nº de acceso de DBJ BAC01599.1 (gi21669149), nº de acceso de DBJ BAC01729.1 (gi21669409), nº de acceso de DBJ BAC01562.1 (gi21669075), nº de acceso de EMBL CAA85590.1 (gi587338), nº de acceso de GenBank AAQ99243.1 (gi37694665), nº de acceso de GenBank AAK94811.1 (gi18025604), nº de acceso de EMBL CAB51297.1 (gi5578794), nº de acceso de DBJ BAC01740.1 (gi21669431) y nº de acceso de DBJ BAC01733.1 (gi21669417). Secuencias aceptoras de cadena pesada alternativas incluyen, por ejemplo, nº de acceso de GenBank AAB35009.1 (gi1041885), nº de acceso de DBJ BAC01904.1 (gi21669789), nº de acceso de GenBank AAD53816.1 (gi5834100), nº de acceso de GenBank AAS86081.1 (gi46254223), nº de acceso de DBJ BAC01462.1 (gi21668870), nº de acceso de GenBank AAC18191.1 (gi3170773), nº de acceso de DBJ BAC02266.1

(gi21670513), nº de acceso de GenBank AAD56254.1 (gi5921589), nº de acceso de GenBank AAD53807.1 (gi5834082), nº de acceso de DBJ BAC02260.1 (gi21670501), nº de acceso de GenBank AAC18166.1 (gi3170723), nº de acceso de EMBL CAA49495.1 (gi33085), nº de acceso de PIR S31513 (gi345903), nº de acceso de GenBank AAS86079.1 (gi46254219), nº de acceso de DBJ BAC01917.1 (gi21669815), nº de acceso de DBJ BAC01912.1 (gi21669805), nº de acceso de GenBank AAC18283.1 (gi3170961), nº de acceso de DBJ BAC01903 (gi21669787), nº de acceso de DBJ BAC01887.1 (gi21669755), nº de acceso de DBJ BAC02259.1 (gi21370499), nº de acceso de DBJ BAC01913.1 (gi21669807), nº de acceso de DBJ BAC01910.1 (gi21669801), nº de acceso de DJB BAC02267.1 (gi21670515), nº de acceso de GenBank AAC18306.1 (gi3171011), nº de acceso de GenBank AAD53817.1 (gi5834102), nº de acceso de PIR E36005 (gi106423), EMBL CAB37129.1 (gi4456494) y GenBank AAA68892.1 (gi186190).

En realizaciones a modo de ejemplo, los anticuerpos humanizados de la invención incluyen CDR y FR de 12A11 de una secuencia aceptora enumerada arriba. Los residuos dentro de las regiones estructurales importantes para la conformación y/o actividad de CDR como se describen en el presente documento se seleccionan para retromutación (si se diferencia entre secuencias donantes yceptoras).

A continuación se seleccionan los residuos para la sustitución del siguiente modo. Cuando un aminoácido se diferencia entre una región estructural variable de 12A11 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., arriba, 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 análisis estructural de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 12A11, y humanización del anticuerpo 12A11, se describen en el Ejemplo VI. Brevemente, se estudiaron modelos tridimensionales para las estructuras de anticuerpo murino resueltas 1KTR para la cadena ligera y 1JRH y 1ETZ para la cadena pesada. Modelos tridimensionales alternativos que pueden estudiarse para la identificación de residuos, importante para la confirmación de CDR (por ejemplo, residuos de vernier), incluyen nº de acceso de PDB 2JEL (gi3212688), nº de acceso de PDB 1TET (gi494639), nº de acceso de PDB 1JP5 (gi16975307), nº de acceso de PDB 1CBV (gi493917), nº de acceso de PDB 2PCP (gi4388943), nº de acceso de PDB 1I9I (gi2050118), nº de acceso de PDB 1CLZ (gi1827926), nº de acceso de PDB 1FL6 (gi17942615) y nº de acceso de PDB 1KEL (gi1942968) para la cadena ligera y PDB 1GGI (gi442938), nº de acceso de PDB 1GGB (gi442934), nº de acceso de PDB 1N5Y (gi28373913), nº de acceso de PDB 2HMI (gi3891821), nº de acceso de PDB 1FDL (gi229915), nº de acceso de PDB 1KIP (gi1942788), nº de acceso de PDB 1KIQ (gi1942791) y nº de acceso de PDB 1VFA (gi576325) para la cadena pesada.

Información estructural tridimensional para los anticuerpos descritos en el presente documento está públicamente disponible, por ejemplo, de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank (PDB). La PDB está libremente accesible por internet y se describe por Berman y col. (2000) Nucleic Acids Research, 28:235. El estudio de estructuras tridimensionales resueltas permite la identificación de residuos que interaccionan con CDR dentro de 12A11. Alternativamente, los modelos tridimensionales para las cadenas VH y VL de 12A11 pueden generarse usando software de modelado informático. Brevemente, un modelo tridimensional se genera basándose en las estructuras de anticuerpo murino resueltas más próximas para las cadenas pesadas y ligeras. Para este fin, 1KTR puede usarse como molde para modelar la cadena ligera de 12A11, y 1ETZ y 1JRH usarse como moldes para modelar la cadena pesada. El modelo puede refinarse adicionalmente por una serie de etapas de minimización de energía para atenuar contactos atómicos desfavorables y optimizar interacciones electrostáticas y de van der Waals. Pueden realizarse análisis tridimensionales adicionales y/o modelado usando 2JEL (2,5Å) y/o 1TET (2,3Å) para la cadena ligera y 1GGI (2,8Å) para la cadena pesada (u otros anticuerpos expuestos arriba) basándose en la similitud entre estas estructuras murinas resueltas y las cadenas de 12A11 respectivas.

El modelo informático de la estructura de 12A11 puede servir además de punto de partida para predecir la estructura tridimensional de un anticuerpo que contiene las regiones determinantes de la complementariedad de 12A11 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 12A11 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 12A11 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 raros 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 12A11 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 12A11 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.

Los residuos de ratón raros 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 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 raro 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 raro en la secuencia donante es en realidad un residuo común en la secuencia aceptora correspondiente, el residuo preferido es claramente el residuo aceptor.

La Tabla 1 resume el análisis de secuencias de las regiones VH y VL de 12A11.

Tabla 1. Resumen de la secuencia de la región V de 12A11

Cadena	VL	VH
Subgrupo ratón	II	Ib
Subgrupo humano	II	II
Aminoácidos raros en ratón vk (% de frecuencia)	185 (3.6 %)	I11 (1,7%)
Chothia Canónico de clase	L1: clase 4 [16f] L2: clase 1 [7] L3: clase 1 [9]	H1: clase 3 [7] H2: clase 1[16] H3 ¹
Estructura resuelta de ratón MAb más aproximada	1KTR ²	1ETZ ³ (2.6Å) y 1JRH ⁴
Homología con la plantilla de modelado	94%	83% y 86%
Secuencia de estructura humana	K64 (BAC01733) (87% FR, 67% en totalidad)	M72 (AAA69734) (61% FR, 45% en totalidad)
Notas donantes	Hu k LC subgrupo II de CDR mismo grupo estructural canónico como 12A11	HU HC subgrupo III de CDR del mismo grupo estructural canónico como 12A11
Notas retromutación	Ninguna	☒ A24F, F29L: H1 R71K: Canónico, H2 V371: Embalaje T28S, V48L, F67L, N73T, L78V: Vernier
Ref. germinal para Hu Fr	A19 VL Vk2-28 mRNA: X63397.1 (GI:33774)	AAA69731.1 (GI:567123)

(Continúa)

- 1 No hay clase canónica pero podría formar una base de doblado de acuerdo con las reglas de Shirai et al. (1999) FEBS Lett. 4 55:188-197.
 2 Kaufmann et al. (2002) J Mol Biol. 318:135-147.
 3 Guddat et al. (2000) J Mol Biol. 302:853-872.
 4 Sogabe et al. (1997) J Mol Biol. 273:882-897.

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

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 a modo de ejemplo, un anticuerpo humanizado de la presente invención contiene (i) una cadena ligera que comprende un dominio variable que comprende CDR de VL de 12A11 murinas y una región estructural aceptora humana, teniendo la región estructural cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más residuos sustituidos con el residuo de 12A11 correspondiente y (ii) una cadena pesada que comprende CDR de VH de 12A11 y una región estructural aceptora humana, teniendo la región estructural al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más residuos sustituidos con el residuo de 12A11 correspondiente, y, opcionalmente, al menos uno, preferentemente dos o tres residuos sustituidos con un residuo de la línea germinal humana correspondiente

En otra realización a modo de ejemplo, un anticuerpo humanizado de la presente invención contiene (i) una cadena ligera que comprende un dominio variable que comprende CDR de VL de 12A11 murinas y una región estructural aceptora humana, teniendo la región estructural al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más residuos retromutados (es decir, sustituidos con el residuo de 12A11 correspondiente), en el que la(s) retromutación (retromutaciones) están en residuos canónicos, de compactación y/o de vernier y (ii) una cadena pesada que comprende CDR de VH de 12A11 y una región estructural aceptora humana, teniendo la región estructural al menos al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más residuos retromutados, en el que la(s) retromutación (retromutaciones) están en residuos canónicos, de compactación y/o de vernier. En ciertas realizaciones, las retromutaciones están solo en residuos de compactación y/o canónicos o están principalmente en residuos canónicos y/o de compactación (por ejemplo, solo 1 ó 2 residuos de vernier de los residuos de vernier que diferencian entre secuencia donante y aceptora están retromutados).

En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados incluyen el menor número de retromutaciones posibles, mientras que retengan una afinidad de unión comparable a la del anticuerpo donante (o una versión quimérica del mismo). Para llegar a tales versiones, diversas combinaciones de retromutaciones pueden eliminarse y los anticuerpos resultantes probarse para eficacia (por ejemplo, afinidad de unión). Por ejemplo, pueden eliminarse retromutaciones (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 retromutaciones) en residuos de vernier, o puede eliminarse retromutación en combinaciones de residuos de vernier y de compactación, de vernier y canónicos o de compactación y canónicos.

En otra realización, 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, cuatro o todas) de las siguientes actividades: (1) se une a Aβ soluble; (2) se une a Aβ1-42 agregado (por ejemplo, como se ha determinado por ELISA); (3) captura Aβ soluble; (4) se une a Aβ en placas (por ejemplo, tinción de placas de EA y/o PDAPP); (5) se une a Aβ con una afinidad no inferior a dos a tres veces inferior a 12A11 quimérico (por ejemplo, 12A11 que tiene secuencias de la región variable murina y secuencias de la región constante humana); (6) media en la fagocitosis de Aβ (por ejemplo, en un ensayo de fagocitosis *ex vivo*, como se describe en el presente documento); y (7) cruza la barrera hematoencefálica (por ejemplo, demuestra localización en el cerebro a corto plazo, por ejemplo, en un modelo animal de PDAPP, como se describe en el presente documento).

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

En otra realización, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describen en el presente documento, y se une específicamente a un epítopo que comprende los residuos 3-7 de Aβ.

En todavía otra realización, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describen en el presente documento, de forma que se une a un epítipo del extremo N dentro de A β (por ejemplo, se une a un epítipo 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 utilizando 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 utilizarse 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, están disponibles una variedad de procedimientos para producir tales inmunoglobulinas. En general, una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) murinas de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo pueden humanizarse, por ejemplo, ponerse en el contexto de una o más regiones estructurales humanas, usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en cebadores. Brevemente, se diseñan cebadores que pueden hibridarse con región (regiones) CDR murina(s) humana(s) que también contienen secuencia que solapa y puede hibridarse con una región estructural humana. Por consiguiente, bajo condiciones apropiadas, los cebadores pueden amplificar una CDR murina de un ácido nucleico molde de anticuerpo murino y añadir al molde amplificado una parte de una secuencia de la región estructural humana. Similarmente, pueden diseñarse cebadores que pueden hibridarse con una región (regiones) estructural(es) humana(s) diana en la(s) que una reacción de PCR usando estos cebadores produce una región (regiones) estructural(es) humana(s) amplificada(s). Si cada producto de amplificación se desnaturaliza, combina e hibrida entonces con el otro producto, la región CDR murina, que tiene secuencia de la región estructural humana solapante con la secuencia de la región estructural humana amplificada, puede ligarse genéticamente. Por consiguiente, en una o más de tales reacciones, una o más regiones CDR murinas pueden ligarse genéticamente a regiones estructurales humanas intervinientes.

En algunas realizaciones, los cebadores también pueden comprender secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción deseables para facilitar la manipulación genética de las secuencias amplificadas de PCR resultantes en un segmento genético mayor, por ejemplo, un segmento de la cadena ligera o pesada variable, cadena pesada, o vector. Además, los cebadores usados para amplificar tanto las regiones CDR murinas como las regiones estructurales humanas pueden tener desapareamientos deseables de forma que un codón diferente se introduzca en la CDR murina o región estructural humana. Desapareamientos típicos introducen alteraciones en las regiones estructurales humanas que preservan o mejoran la orientación estructural de la CDR murina y así su afinidad de unión, como se describe en el presente documento.

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

Debido a la degeneración del código, 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 describe arriba (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., arriba, 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. Los isotipos humanos IgG1 e IgG4 son a modo de ejemplo. 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.

En una realización, un anticuerpo humanizado de la invención incluye la región VH de 12A11v.1 ligada a una región constante de IgG1, como se muestra a continuación en SEC ID N°: 52.

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAFSGFSLSTSGMSVGWIRQAPGKGLEWLAHI
 WWDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTTTAD
 YFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG(K)

En otra realización, un anticuerpo humanizado de la invención incluye la región VH de 12A11v.1 ligada a una región constante de IgG4, como se muestra a continuación en SEC ID N°: 53.

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAFSGFSLSTSGMSVGWIRQAPGKGLEWLAHI
 WWDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTTTAD
 YFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKSNTKV
 DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPG(K)

En otra realización más, un anticuerpo humanizado de la invención incluye una región VH de 12A11v3.1 ligada a una región constante de IgG1 o IgG4, como se muestra a continuación en SEC ID N°: 54 y 55, respectivamente.

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAFSGFTLSTSGMSVGVWIRQAPGKGLEWLAHI
 WWDDDKYYNP SLKSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTTTAD
 YFAYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 5 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 10 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG(K)
 15 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAFSGFTLSTSGMSVGVWIRQAPGKGLEWLAHI
 WWDDDKYYNP SLKSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTTTAD
 YFAYWGQGT TTVTVSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAFSGFSLSTSGMSVGV
 20 IRQAPGKGLEWLAHIWWDDDKYYNP SLKSRLTISKDTSKNTVYLQMNSLRAED
 TAVYYCARRTTTADYFAYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT
 25 YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
 30 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
 RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG(K)

En algunas realizaciones, la lisina terminal, como se muestra entre paréntesis, se expresa opcionalmente.

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento se modifican para potenciar su actividad de citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC) usando técnicas tales como, por ejemplo, aquellas descritas en la patente de EE.UU. n.º 6.946.292. Generalmente se cree que la actividad de ADCC de anticuerpos requiere la unión de la región Fc de un anticuerpo a un anticuerpo receptor que existe sobre la superficie de una célula efectora tal como, por ejemplo, una célula asesina, un linfocito citolítico espontáneo y un macrófago activado. Alterando la fucosilación (por ejemplo, reduciendo o eliminando) de la estructura del hidrato de carbono de un anticuerpo humanizado (es decir, en la región Fc), la actividad de ADCC del anticuerpo puede potenciarse *in vitro*, por ejemplo, 10 veces, o 20 veces, o 30 veces, o 40 veces, o 50 veces, o 100 veces, con respecto a un anticuerpo humanizado sin modificar. Debido a la elevada actividad de ADCC, tales anticuerpos modificados pueden usarse a menores dosificaciones que sus homólogos sin modificar y generalmente tienen menos efectos secundarios o efectos secundarios reducidos en pacientes.

En algunas realizaciones, las versiones de aglicosilo de anticuerpos humanizados son destacadas, incluyendo tales anticuerpos una región constante aglicosilada. El oligosacárido en Asn-297 es un rasgo característico de anticuerpos IgG humanos normales (véase, Kabat y col., 1987, Sequence of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health Human Services Publication). Cada una de las dos cadenas pesadas en moléculas de IgG tiene un único grupo de hidrato de carbono de cadena ramificada que está ligado al grupo amida del residuo de asparagina, por ejemplo, en la posición 297. La sustitución de, por ejemplo, asparagina con alanina previene la glicosilación del anticuerpo, como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.706.265. En una realización particular, el residuo de aminoácido Asn en la posición 297 está mutado a alanina.

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 (por ejemplo, células COS o CHO). 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 procariota 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 procariotas 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 y 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 de la utilización 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 y posterior expresión en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer y col., documento US 5.741.957, Rosen, documento US 5.304.489, y Meade y col., documento US 5.849.992). 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.

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

Pueden usarse diversos procedimientos para expresar anticuerpos recombinantes en plantas transgénicas. Por ejemplo, las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos pueden clonarse independientemente en vectores de expresión (por ejemplo, vectores de *Agrobacterium tumefaciens*), seguido de la transformación de tejido de planta *in*

vitro con la bacteria recombinante o transformación directa usando, por ejemplo, partículas recubiertas con el vector que entonces se introducen físicamente en el tejido de planta usando, por ejemplo, balística. Posteriormente se reconstituyen las plantas completas que expresan cadenas individuales, seguido de su cruce sexual, produciendo por último lugar la producción de un anticuerpo completamente ensamblado y funcional. Se han usado protocolos similares para expresar anticuerpos funcionales en plantas de tabaco (véase Hiatt y col. (1989) *Nature* 342:76-87). En diversas realizaciones, pueden utilizarse secuencias señal para promover la expresión, unión y plegamiento de cadenas de anticuerpo sin ensamblar dirigiendo las cadenas al entorno de la planta apropiado (por ejemplo, el entorno acuoso del apoplasto u otros tejidos de planta específicos que incluyen tubérculos, fruta o semilla) (véase Fiedler y col. (1995) *Bio/Technology* 13:1090-1093). También pueden usarse biorreactores para plantas para aumentar el rendimiento del anticuerpo y para reducir significativamente los costes.

Los 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 utiliza comúnmente para células procariotas, 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, 2ª ed., 1989). 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., arriba). 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.

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)). Para usos farmacéuticos se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95% de homogeneidad, y son las más preferidas del 98 al 99% o más de homogeneidad.

6. Fragmentos de anticuerpos

Para uso 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.

En algunas realizaciones, la semivida generalmente corta de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fabs o Fab) se prolonga por PEGilación. Esto se consigue generalmente por fusión con polietilenglicol (PEG) como se describe, por ejemplo, por Leong y col. *Cytokine* 16, 106-119 (2001). La PEGilación tiene la ventaja añadida de eliminar función mediada por receptor de Fc, si se desea, y/o reducir inmunogenicidad. En realizaciones a modo de ejemplo, moléculas de PEG de 2-20 kDa se unen covalentemente, por ejemplo, a una cadena pesada de la región bisagra del anticuerpo mediante K-ligador-C (véase, por ejemplo, Choy y col., *Rheumatol.* 41:1133-1137 (2002)).

7. Mapeo de epítopes

El mapeo de epítopes puede realizarse para determinar qué determinante antigénico o epítope de Aβ es reconocido por el anticuerpo. En una realización, el mapeo de epítopes se realiza según análisis de NET de sustitución (rNET). El ensayo de mapeo de epítopes de rNET proporciona información sobre la contribución de residuos individuales dentro del epítope a la actividad de unión global del anticuerpo. El análisis de rNET usa análogos de péptidos sustituidos individuales sistemáticos sintetizados. La unión de un anticuerpo que se prueba se determina contra péptido nativo (antígeno nativo) y contra 19 péptidos "sustituidos individuales" alternativos, estando cada péptido sustituido en una primera posición con uno de los 19 aminoácidos no nativos para esa posición. Se genera un perfil que refleja el efecto de sustitución en esa posición con los diversos residuos no nativos. Los perfiles se generan asimismo en posiciones sucesivas a lo largo del péptido antigénico. El perfil combinado, o mapa de epítopes (que refleja la sustitución en cada posición con los 19 residuos no nativos) puede entonces compararse con un mapa similarmente generado para un segundo anticuerpo. Mapas sustancialmente similares o idénticos indican que los anticuerpos que se comparan tienen la misma especificidad por epítope o similar.

8. Prueba de anticuerpos para eficacia terapéutica (por ejemplo, actividad de eliminación de plagas) en modelos animales

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, humanizados o quiméricos 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 . Los anticuerpos humanizados y/o quiméricos se preparan como se describe en el presente documento.

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 inmunogén. 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.

9. Prueba de anticuerpos para unirse a A β oligomérico soluble

La divulgación también proporciona procedimientos de prueba de la capacidad de un anticuerpo para unirse a A β oligomérico soluble en un ensayo bioquímico. El ensayo bioquímico se basa, al menos en parte, en una comparación de la unión de un anticuerpo a una o más formas de A β oligomérico soluble (por ejemplo, dímeros de A β , trímeros de A β , tetrameros de A β , pentámeros de A β y similares) con respecto a la unión del anticuerpo a A β monomérico. Esta comparación puede usarse para determinar una unión relativa del anticuerpo a A β oligomérico soluble con respecto a A β monomérico. En diversas realizaciones, esta unión relativa se compara con una unión relativa correspondiente de un reactivo de control a una o más especies de A β oligomérico soluble frente a A β monomérico. En otros aspectos, la afinidad de un anticuerpo por una o más especies de A β oligomérico se compara con la afinidad del anticuerpo por A β monomérico en la preparación de A β . Se ha descubierto que existe una fuerte correlación entre una capacidad del anticuerpo para A β para unirse preferencialmente a especies de A β oligomérico soluble y la capacidad del anticuerpo para mejorar rápidamente la cognición como se evalúa por un ensayo de CFC en un modelo animal apropiado, como se describe en detalle más adelante. Se cree adicionalmente que una capacidad del anticuerpo para mejorar la cognición en el ensayo de CFC es un indicador fuerte o factor pronóstico de la eficacia terapéutica humana definitiva del anticuerpo (en particular, eficacia en la cognición que mejora rápidamente en un paciente). Por consiguiente, una comparación de preferencias y/o afinidades de unión a anticuerpo para A β conduce a la identificación de ciertos anticuerpos como candidatos para su uso en los procedimientos terapéuticos de la invención, en particular, para su uso en el procedimiento para efectuar la rápida mejora en la cognición en un paciente.

Los anticuerpos candidatos presentan una unión preferencial o mayor unión a una o más especies de A β oligomérico soluble con respecto a A β monomérico. Los anticuerpos que se unen preferencialmente a, por ejemplo, dímeros, trímeros y tetrameros de A β con respecto a A β monomérico son candidatos preferidos para su uso en procedimientos para efectuar la rápida mejora en la cognición en un paciente. Por ejemplo, anticuerpos candidatos que presentan una unión de dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, diez veces, veinte veces o mayor a las especies de A β oligomérico soluble con respecto a A β monomérico se seleccionan para su uso en los procedimientos terapéuticos.

La unión de un anticuerpo a una o más especies de A β oligomérico soluble o a A β monomérico puede determinarse cualitativamente, cuantitativamente, o combinación de ambas. En general puede usarse cualquier técnica que pueda distinguir especies de A β oligomérico de A β monomérico en una preparación de A β que comprende las especies. En realizaciones a modo de ejemplo pueden usarse uno o más de inmunoprecipitación, separación electroforética y separación cromatográfica (por ejemplo, cromatografía de líquidos) para distinguir especies de A β oligomérico de A β monomérico en una preparación de A β que comprende las especies.

En realizaciones preferidas, la unión del anticuerpo a una o más especies de A β oligomérico soluble o a A β monomérico se determina inmunoprecipitando las especies de A β de la preparación. El inmunoprecipitado se somete entonces a una separación electroforética (por ejemplo, SDS-PAGE) para distinguir especies oligoméricas de A β monomérico en el precipitado. La cantidad de especies de A β oligomérico y A β monomérico presentes en las bandas electroforéticas puede visualizarse, por ejemplo, inmunotransfiriendo el gel electroforético o por cuantificación directa de las especies respectivas en las bandas del gel electroforético. La cantidad de precipitado para una especie de A β puede determinarse, por ejemplo, a partir de la intensidad de las bandas electroforéticas correspondientes, bandas de inmunotransferencia, o una combinación de ambas. La determinación de la intensidad puede ser cualitativa, cuantitativa, o una combinación de ambas.

La evaluación de la intensidad de bandas puede realizarse, por ejemplo, usando exposiciones de película apropiadas que pueden escanearse y determinarse la densidad de bandas con software, por ejemplo, el software AlphaEase™ (AlphaInnotech™). La evaluación de la intensidad de bandas puede realizarse, por ejemplo, usando distintas marcas incorporadas en el anticuerpo, un reactivo de obtención de imágenes (por ejemplo, un anticuerpo usado en una inmunotransferencia), o ambos. Marcas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, marcas fluorescentes, marcas radiactivas, marcas paramagnéticas, o combinaciones de las mismas.

En diversas realizaciones, la cantidad de una o más especies de A β oligomérico y/o A β monomérico que se unen a un anticuerpo puede evaluarse usando espectrometría de masas, por ejemplo, sobre la propia preparación de A β un tiempo adecuado después de que se haya puesto en contacto con el anticuerpo, o sobre A β monomérico y/o una o más especies de A β oligomérico soluble unidas al anticuerpo que han sido extraídas de la preparación de A β .

En ciertos aspectos, la afinidad de un anticuerpo por una o más especies de A β oligomérico se compara con la afinidad del anticuerpo por A β monomérico para identificar el anticuerpo como candidato para su uso en los procedimientos terapéuticos de la invención, en particular, para su uso en el procedimiento para efectuar la rápida mejora en la cognición en un paciente. La afinidad del anticuerpo de prueba (por ejemplo, un anticuerpo para A β) por A β oligomérico con respecto a A β monomérico puede compararse con las afinidades de unión de un reactivo de control. Pueden usarse marcas para evaluar la afinidad de un anticuerpo para A β monomérico, A β oligomérico, o ambos. En diversas realizaciones, un reactivo primario con afinidad por A β no se marca y se usa un agente de marcado secundario para unirse al reactivo primario. Marcas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, marcas fluorescentes, marcas paramagnéticas, marcas radiactivas, y combinaciones de las mismas.

En ciertos aspectos, los usos médicos de la invención muestran la administración de un anticuerpo anti-A β que puede mejorar rápidamente la cognición en un sujeto en el que el anticuerpo anti-A β se ha identificado en el uso de un ensayo que es adecuadamente predictivo de eficacia inmunoterapéutica en el sujeto. En realizaciones a modo de ejemplo, el ensayo es un ensayo bioquímico que se basa, al menos en parte, en una comparación de la unión de uno o más oligómeros de A β en una preparación de A β a un agente inmunoterapéutico de prueba con la unión de monómeros de A β en la preparación de A β con el agente inmunoterapéutico de prueba. El uno o más oligómeros de A β pueden incluir, por ejemplo, uno o más de dímeros de A β , trímeros de A β , tetrámeros de A β y pentámeros de A β . En diversas realizaciones, el agente inmunoterapéutico de prueba se identifica cuando la unión de uno o más oligómeros de A β en la preparación de A β con el agente inmunoterapéutico de prueba es mayor que la unión de y monómeros en la preparación de A β al agente inmunoterapéutico de prueba. La cantidad de monómeros de A β y una o más especies de oligómeros de A β en una preparación de A β que se une a un reactivo inmunológico de prueba puede evaluarse usando procedimientos bioquímicos, por ejemplo, usando inmunoprecipitación para precipitar de la preparación de A β los monómeros de A β y una o más especies de oligómero de A β unidas al reactivo inmunológico de prueba, seguido de una separación electroforética de los inmunoprecipitados. Tales ensayos bioquímicos se tratan adicionalmente en el presente documento y en el documento US2006/0240486.

10. Cribado de anticuerpos para actividad de eliminación

La revelación 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 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 de amiloide. El anticuerpo usado para la tinción puede ser o puede no ser el 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 de amiloide compactas como difusas, por ejemplo, el anticuerpo 12A11 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 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, proteoglucanos, 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.

11. Prueba de anticuerpos para una mejora rápida o prolongada en la cognición en un ensayo de CFC

En diversos aspectos, un anticuerpo de la invención puede probarse para la capacidad para mejorar la cognición en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo para mejorar la cognición en un modelo animal para EA, como se evalúa por un ensayo de condicionamiento de miedo contextual (CFC), puede usarse para seleccionar el anticuerpo como candidato para su uso en los procedimientos terapéuticos de la invención, en particular, en procedimientos para efectuar la rápida mejora en la cognición en un paciente.

El condicionamiento de miedo contextual es una forma común de aprendizaje que es excepcionalmente fidedigna y se adquiere rápidamente en la mayoría de los animales, por ejemplo, mamíferos. Los animales de ensayo aprenden a tener un estímulo previamente neutro debido a su asociación con una experiencia aversiva y/o pista(s) ambiental(es) (véase, por ejemplo, Fanselow, Anim. Learn. Behav. 18:264-270 (1990); Wehner y col., Nature Genet. 17:331-334. (1997); Caldarone y col., Nature Genet. 17:335-337 (1997)).

El condicionamiento de miedo contextual es especialmente útil para determinar función o disfunción cognitiva, por ejemplo, como resultado de enfermedad o un trastorno, tal como una enfermedad neurodegenerativa o trastorno, una enfermedad o trastorno relacionado con A β , una enfermedad o trastorno amiloidogénico, la presencia de una función cognitiva afectiva por alteración genética desfavorable (por ejemplo, mutación genética, alteración genética o genotipo no deseado), y/o la eficacia de un agente, por ejemplo, un agente de anticuerpo, sobre la capacidad cognitiva. Por consiguiente, el ensayo de CFC proporciona un procedimiento para probar independientemente y/o validar el efecto terapéutico de agentes para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno cognitivo, y en particular, una enfermedad o trastorno que afecta a una o más regiones de los cerebros, por ejemplo, el hipocampo, subículo, corteza del cíngulo, corteza prefrontal, corteza peririnal, corteza sensorial y lóbulo temporal medial.

Normalmente, el ensayo de CFC se realiza usando cámaras para animales convencionales y el empleo de entrenamiento de condicionamiento que comprende un choque suave (por ejemplo, choque en la pata a 0,35 m) emparejado con una pista auditiva (por ejemplo, un periodo de ruido blanco de 85 db), olfativa (por ejemplo, extracto de almendra o de limón), de tacto (por ejemplo, textura del fondo de la jaula) y/o visual (destello de luz). Alternativamente, el entrenamiento de condicionamiento comprende la administración del choque ausente de una pista emparejada (es decir, choque asociado al contexto). La respuesta a la experiencia aversiva (choque) es normalmente una de congelación (ausencia de movimiento, excepto de respiración), pero también puede incluir parpadeo de los ojos, o cambio en el reflejo de la membrana nictitante, dependiendo del animal de ensayo seleccionado. La respuesta aversiva se caracteriza normalmente en el día de entrenamiento en determinar una referencia para el miedo sin condicionar con resultados de respuesta aversiva en los días de prueba posteriores (por ejemplo, congelación en el mismo contexto, pero en ausencia del estímulo aversivo y/o congelación en presencia de la pista, pero en ausencia de la experiencia aversiva), caracterizándose como miedo contextualmente condicionado. Para fiabilidad mejorada, los animales de prueba se prueban normalmente por separado por técnicos independientes y se puntúan con el tiempo. Detalles adicionales del diseño experimental pueden encontrarse en la materia, por ejemplo, en Crawley, JN, What's Wrong with my Mouse; Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Wiley-Liss, NY (2000).

Animales de ensayo a modo de ejemplo (por ejemplo, animales modelo) incluyen mamíferos (por ejemplo, roedores o primates no humanos) que presentan síntomas importantes o patología que son característicos de un trastorno amiloidogénico tal como Alzheimer. Pueden crearse animales modelo mediante reproducción endogámica selectiva para un deseado o pueden manipularse genéticamente usando técnicas transgénicas que son muy conocidas en la técnica, tal como una alteración genética elegida como diana (por ejemplo, una mutación genética, alteración genética) en un gen que está asociado al trastorno de demencia, conduciendo a expresión o función anómala del gen elegido como diana. Por ejemplo, están disponibles varias cepas de ratón transgénico que expresan en exceso APP y desarrollan patología de placas de amiloide y/o desarrollan déficits cognitivos que son característicos de enfermedad de Alzheimer (véanse, por ejemplo, Games y col., arriba, Johnson-Wood y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550 (1997); Masliah E y Rockenstein E. (2000) J Neural Transm Suppl.; 59:175-83).

Alternativamente, el modelo animal puede crearse usando compuestos químicos (por ejemplo, neurotoxinas,

anestésicos) o técnicas quirúrgicas (por ejemplo, ablación estereotáctica, axotomización, transección, aspiración) que extirpan o interfieren de otro modo con la función normal de una región anatómica del cerebro (por ejemplo, hipocampo, amígdala, corteza perirrinal, núcleo septal medial, locus cerúleo, cuerpos mamilares) o neuronas específicas (por ejemplo, neuronas serotoninérgicas, colinérgicas o dopaminérgicas) que están asociadas a síntomas característicos o patología del trastorno amiloidogénico. En ciertas realizaciones preferidas, el modelo animal presenta un déficit cognitivo importante asociado al aprendizaje o memoria, además de la patología neurodegenerativa que se asocia a un trastorno amiloidogénico. Más preferentemente, el déficit cognitivo empeora progresivamente al aumentar la edad, de forma que la progresión de la enfermedad en el animal modelo es paralela a la progresión de la enfermedad en un sujeto que padece el trastorno amiloidogénico.

El condicionamiento de medio condicional y otros ensayos *in vivo* para probar la funcionalidad de los anticuerpos descritos en el presente documento puede realizarse usando ratones naturales o ratones que tienen una cierta alteración genética que conduce a memoria alterada o modelos de ratón de enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, que incluye modelos de ratón que muestran niveles elevados de A β soluble en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o plasma. Por ejemplo, modelos animales para enfermedad de Alzheimer incluyen ratones transgénicos que expresan en exceso la mutación "Swedish" de proteína precursora de amiloide humana (hAPP^{sw}; Tg2576) que muestran déficits de memoria dependientes de la edad y placas (Hsiao y col. (1996) Science 274:99-102). La funcionalidad *in vivo* de los anticuerpos descritos en el presente documento también puede probarse usando ratones transgénicos PDAPP, que expresan una forma mutante de APP humana (APP^{V71F}) y desarrollan enfermedad de Alzheimer a una edad temprana (Bard y col. (2000) Nature Medicine 6:916-919; Masliah E y col. (1996) J Neurosci. 15; 16(18):5795-811). Otros modelos de ratón para enfermedad de Alzheimer incluyen el ratón PSAPP, un ratón doblemente transgénico (PSAPP) que expresa en exceso APP mutante y transgenes de PS1, descrito en Holcomb y col. (1998) Nature Medicine 4:97-110, y el ratón mutante PS-1, descrito en Duff y col. (1996) Nature 383, 710-713. Otros modelos transgénicos genéticamente alterados de enfermedad de Alzheimer se describen en Masliah E y Rockenstein E. (2000) J Neural Transm Suppl. 59:175-83.

En diversos aspectos, los procedimientos de la invención comprenden la administración de un anticuerpo anti-A β que puede mejorar rápidamente la cognición en un sujeto en el que el anticuerpo anti-A β se ha identificado en el uso de un ensayo que es adecuadamente predictivo de eficacia inmunoterapéutica en el sujeto. En realizaciones a modo de ejemplo, el ensayo es un ensayo de animal modelo que se basa, al menos en parte, en comparar la cognición, como se ha determinado a partir de un estudio de condicionamiento de miedo contextual, de un animal después de la administración de un reactivo inmunológico de prueba al animal, con respecto a un control adecuado. El ensayo de CFC evalúa cambios en la cognición de un animal (normalmente un ratón o rata) tras el tratamiento con un posible compuesto terapéutico. En ciertas realizaciones, el cambio en la cognición evaluado es una mejora en el estado de alteración de la memoria o una inversión del déficit de memoria. Por consiguiente, el ensayo de CFC proporciona un procedimiento directo para determinar el efecto terapéutico de agentes para prevenir o tratar enfermedad cognitiva, y en particular, una enfermedad o trastorno que afecta a una o más regiones de los cerebros, por ejemplo, el hipocampo, subículo, corteza del cíngulo, corteza prefrontal, corteza perirrinal, corteza sensorial y lóbulo temporal medial. Tales ensayos de CFC se tratan adicionalmente en el presente documento y en el documento WO 2006/066118.

12. 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 EU (es decir, el índice EU de Kabat y col., arriba) 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 (FcγRI)). 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 bisagra (Leu234-Ser239 según el sistema de numeración EU). Además, el receptor de FcγRI 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 bisagra muestra que la secuencia de las posiciones de numeración EU 234 a 238, es decir, Leu-Leu-Gly-Gly-Pro (SEC ID N°: 32) en los ligantes fuertes se convierte en Leu-Glu-Gly-Gly-Pro (SEC ID N°: 33) 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 FcγI. Se entiende que pueden hacerse otras alteraciones para lograr los mismos resultados o similares. Por ejemplo, la afinidad de la unión a FcγRI 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 FcγRI humano, el cambio de Leu en la posición EU 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 en las posiciones EU 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 las posiciones de aminoácidos EU 234, 235, 236 ó 237. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado que incluye alteraciones de aminoácidos en una o más posiciones EU 234, 235, 236 y 237. En una realización particular de la invención, un anticuerpo humanizado incluye alteraciones de aminoácidos en las posiciones EU 234 y 237 de la región de unión bisagra derivada de IgG1 (es decir, L234A y G237A).

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 Clq,Clr y Cls que se unen muy juntas. Se ha mostrado que Clq es responsable de la unión del complejo de tres proteínas a un anticuerpo.

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

Además, haciendo mutaciones en estos residuos se ha mostrado que la unión de Clq 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 Clq 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 Clq. 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 Clq. 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 Clq.

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 Clq.

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 Clq. 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 IgG1 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. nº 5.677.425). 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.

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.

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.

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.

13. Maduración por afinidad

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

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

Un enfoque para madurar por afinidad una molécula de unión es para sintetizar un ácido nucleico que codifica la molécula de unión, o porción de la misma, que codifica el cambio o cambios deseados. La síntesis de oligonucleótidos es muy conocida en la técnica y se automatiza fácilmente para producir uno o más ácidos nucleicos que tienen cualquier cambio de codones deseado. De esta forma también pueden introducirse sitios de restricción, mutaciones silenciosas y uso de codones favorables. Alternativamente, uno o más codones pueden alterarse para representar un subconjunto de aminoácidos particulares, por ejemplo, un subconjunto que excluye cisteínas que pueden formar enlaces disulfuro, y se limita a una región definida, por ejemplo, una región CDR o porción de la misma. Alternativamente, la región puede representarse por un conjunto parcialmente o totalmente al azar de aminoácidos (para detalles adicionales véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.830.650; 5.798.208; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.723.323; 4.528.266; 4.359.53; 5.840.479; y 5.869.644).

Se entiende que los enfoques anteriores pueden llevarse a cabo en parte o por completo usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es muy conocida en la técnica y tiene la ventaja de incorporar oligonucleótidos, por ejemplo, cebadores o ácidos nucleicos monocatenarios que tienen, por ejemplo, alteración (alteraciones) deseada(s), en un ácido nucleico bicatenario y en cantidades amplificadas adecuadas para otras manipulaciones, tales como ingeniería genética en un vector de expresión o de clonación apropiado. Tal PCR también puede llevarse a cabo en condiciones que permitan la incorporación errónea de nucleótidos para así introducir variabilidad adicional en los ácidos nucleicos que se amplifican. Detalles experimentales para llevar a cabo PCR y kits relacionados, reactivos y diseño de cebadores pueden encontrarse, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.683.202; 4.683.195; 6.040.166; y 6.096.551. Los procedimientos para introducir regiones CDR en regiones estructurales de anticuerpos usando PCR basada en cebadores se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.858.725. Se describen procedimientos para la amplificación por PCR basada en cebadores de bibliotecas de anticuerpos (y bibliotecas preparadas según el procedimiento) empleando un conjunto mínimo de cebadores que pueden encontrar homología de secuencias con un mayor conjunto de moléculas de anticuerpo, de forma que pueda amplificarse eficazmente un conjunto mayor y diverso de moléculas de anticuerpo, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.780.225; 6.303.313; y 6.479.243. También pueden usarse procedimientos no basados en PCR para realizar mutagénesis dirigida a sitio e incluyen mutagénesis de 'Kunkel' que emplea moldes que contienen uracilo monocatenario y cebadores que se hibridan e introducen una mutación cuando se pasan a través de una cepa particular de *E. coli* (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.873.192).

Procedimientos adicionales para variar una secuencia de anticuerpos, o porción de la misma, incluyen síntesis de ácidos nucleicos o PCR de ácidos nucleicos bajo condiciones no óptimas (es decir, propensas a error), desnaturalización y renaturalización (hibridación) de tales ácidos nucleicos, digestión con exonucleasa y/o endonucleasa, seguido de reensamblaje por ligación o PCR (barajado de ácidos nucleicos), o una combinación de una o más de las técnicas anteriores como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 6.440.668; 6.238.884; 6.171.820; 5.965.408; 6.361.974; 6.358.709; 6.352.842; 4.888.286; 6.337.186; 6.165.793; 6.132.970; 6.117.679; 5.830.721; y 5.605.793.

En cierta realización, bibliotecas de anticuerpos (o bibliotecas de maduración por afinidad) que comprenden una familia de moléculas candidatas de anticuerpo que tienen diversidad en ciertas porciones de la molécula candidata de anticuerpo, por ejemplo, en una o más regiones CDR (o una parte de las mismas), una o más regiones estructurales, y/o una o más regiones constantes (por ejemplo, una región constante que tiene función efectora) pueden expresarse y cribarse para propiedades deseadas usando técnicas reconocidas en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.291.161; 6.291.160; 6.291.159; y 6.291.158). Por ejemplo, pueden construirse bibliotecas de expresión de dominios variables de anticuerpos que tienen una diversidad de secuencias de CDR3 y procedimientos para producir bibliotecas de anticuerpos humanos que tienen una diversidad de secuencias de CDR3 introduciendo, por mutagénesis, una diversidad de secuencias de CDR3 y recuperando la biblioteca (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.248.516).

Finalmente, para expresar los anticuerpos madurados por afinidad, los ácidos nucleicos que codifican las moléculas candidatas de anticuerpo pueden introducirse en células en un formato de expresión apropiado, por ejemplo, como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de longitud completa (por ejemplo, IgG), fragmentos Fab de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂), o como anticuerpos monocatenarios (scFv) usando tecnologías de transfección/transformación de vectores y células convencionales (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.331.415; 6.103.889; 5.260.203; 5.258.498; y 4.946.778).

B. Ácido nucleico que codifica agentes inmunológicos y terapéuticos

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 a modo de ejemplo incluyen aquellos de genes de inmunoglobulina de la cadena ligera o pesada y/o del promotor y potenciador temprano intermedio mayor del CMV (Stinski, patentes de EE.UU. nº 5.168.062 y 5.385.839). 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.

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 rabdovirus, 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)).

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 Eband 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).

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 administrado en asociación con un agente que facilita la transfección. Los polinucleótidos desnudos se clonan algunas veces en un vector de plásmido. Tales vectores pueden incluir adicionalmente agentes de facilitación tales como bupivacaína (Weiner y col., documento US 5.593.972). También puede administrarse ADN usando una pistola de genes. Véase Xiao & Brandsma, arriba. 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 invención se refiere, entre otros, al tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con Aβ, que incluyen trastornos y enfermedades amiloidogénicos caracterizados por Aβ soluble (por ejemplo Alzheimer). La invención también se refiere al uso de los reactivos inmunológicos desvelados (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con Aβ o enfermedad o trastorno amiloidogénico. Los usos médicos de la invención comprenden administración de los reactivos inmunológicos desvelados (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas contra epítopes específicos dentro de Aβ) a un paciente en condiciones que generan una respuesta terapéutica beneficiosa en un paciente (por ejemplo, rápida mejora en la cognición, inducción de fagocitosis de Aβ, reducción de la carga de

placas, inhibición de la formación de placas, reducción de distrofia neurítica y/o inversión, tratamiento o prevención del empeoramiento cognitivo) en el paciente, por ejemplo, para la prevención o tratamiento de las enfermedades o trastornos relacionados con A β o enfermedad o trastornos amiloidogénicos. Tales enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y deterioro cognitivo leve. La última puede producirse con o sin otras características de una enfermedad amiloidogénica.

Se apreciará por aquellos expertos en la materia que los reactivos inmunológicos de la invención pueden usarse para tratar cualquier trastorno para el que se muestra que el tratamiento con dichos reactivos inmunológicos proporciona un beneficio terapéutico a un paciente que padece el trastorno. Por ejemplo, el trastorno puede ser cualquier trastorno cognitivo, por ejemplo, un trastorno de demencia. Tales déficits cognitivos pueden tener varios orígenes: un mecanismo funcional (ansiedad, depresión), envejecimiento fisiológico (alteración de la memoria asociada a la edad), fármacos o lesiones anatómicas. Indicaciones para las que los agentes inmunoterapéuticos de la invención pueden ser útiles incluyen discapacidades del aprendizaje o déficits de memoria debido a exposición a productos tóxicos, lesión cerebral que conduce a amnesia, edad, esquizofrenia, epilepsia, retraso mental, amnesia alcohólica, síndrome de Korsakoff, amnesia inducida por la medicación (por ejemplo, Halcion), migrañas de la arteria basilar, o amnesias asociadas a encefalitis por herpes simple.

Algunos usos médicos de la invención comprenden administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un componente de un depósito de amiloide al paciente. Tales usos médicos son particularmente útiles para prevenir o tratar enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos. Usos médicos a modo de ejemplo comprenden administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une a A β . Usos médicos preferidos comprenden administrar una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de A β , por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-3 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-4 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-5 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-6 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-7 de A β , o anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 3-7 de A β . En otro aspecto más, la invención presenta administrar anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende un residuo del extremo N libre de A β . En otro aspecto más, la invención presenta administrar anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de A β en el que el residuo 1 y/o el residuo 7 de A β es ácido aspártico. En otro aspecto más, la invención presenta administrar anticuerpos que se unen específicamente al péptido A β sin unirse a proteína precursora de amiloide (APP) de longitud completa. En otro aspecto más, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana. En otro aspecto más, el isotipo del anticuerpo es IgG4 humana. En otro aspecto, un anticuerpo humano de la invención se manipula para tener un isotipo que tiene función efectora reducida (por ejemplo, fagocitosis mediada por Fc reducida, capacidad reducida para opsonizar placas, etc.). En una realización particular, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo 12A11 humanizado (por ejemplo, 12A11 v.1 humanizado) que tiene un isotipo IgG4.

En otro aspecto más, la invención presenta administrar anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende un residuo del extremo N libre de A β . En otro aspecto más, la invención presenta administrar anticuerpos que se unen específicamente al péptido A β sin unirse a proteína precursora de amiloide (APP) de longitud completa. En otro aspecto más, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana. En otra realización más, la invención presenta administrar anticuerpos que se unen a y/o capturar A β soluble.

En otro aspecto más, la invención presenta administrar anticuerpos que se unen a un depósito de amiloide en el paciente e inducen una respuesta de eliminación contra el depósito de amiloide. Por ejemplo, una respuesta de eliminación tal puede efectuarse por fagocitosis mediada por receptor de Fc. Una respuesta de eliminación tal puede manipularse en un anticuerpo, por ejemplo, que incluye un dominio de unión a receptor de Fc (por ejemplo, una región constante de IgG2a).

Los procedimientos pueden usarse en pacientes que actualmente muestran síntomas de enfermedad. Los anticuerpos usados para la inmunización pasiva o inmunoterapia de sujetos humanos con enfermedades o trastornos relacionados con A β o enfermedades o trastornos amiloidogénicos 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, la invención presenta administrar un anticuerpo con un vehículo farmacéutico como una 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 nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

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.

Así, la invención satisface una necesidad que viene de largo de pautas terapéuticas para mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado a una enfermedad o trastorno relacionado con A β o enfermedad o trastorno amiloidogénico (por ejemplo, EA).

A. Rápida mejora en la cognición

La presente invención proporciona usos médicos para efectuar la rápida mejora en la cognición en un paciente que tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad o trastorno relacionado con A β o enfermedad o trastorno amiloidogénico (por ejemplo, EA). En aspectos preferidos, los usos médicos presentan administrar una dosis eficaz de un reactivo inmunológico de 12A11 de forma que se logre una rápida mejora en la cognición. En aspectos a modo de ejemplo de la invención se logra la mejora en uno o más déficits cognitivos en el paciente (por ejemplo, déficits del aprendizaje procedural y/o de memoria). El déficit cognitivo puede ser una alteración en la memoria explícita (también conocida como memoria "declarativa" o "de trabajo"), que se define como la capacidad para almacenar y recuperar información específica que está disponible para la consciencia y que puede, por tanto, expresarse por el lenguaje (por ejemplo, la capacidad para recordar un hecho o evento específico). Alternativamente, el déficit cognitivo puede ser una alteración en la memoria procedural (también conocida como memoria "implícita" o "contextual"), que se define como la capacidad para adquirir, retener y recuperar información o conocimiento general que no está disponible para la consciencia y que requiere el aprendizaje de habilidades, asociaciones, hábitos o complejos reflejos para expresarse, por ejemplo, la capacidad para recordar cómo ejecutar una tarea específica. Los individuos que padecen déficits de la memoria procedural están mucho más alterados en su capacidad para funcionar normalmente. Como tales, los tratamientos que son eficaces en mejorar los déficits en memoria procedural son altamente deseables y ventajosos.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona usos médicos para efectuar una rápida mejora en la cognición en un sujeto que comprende la administración de un agente de anticuerpo al sujeto de forma que se logre una rápida mejora en el plazo de un mes después de la administración del anticuerpo. En otras realizaciones, la rápida mejora en la cognición se logra en el plazo de una semana después de la administración del anticuerpo. En otras realizaciones, la rápida mejora en la cognición se logra en el plazo de un día después de la administración del anticuerpo. En otras realizaciones más, la rápida mejora en la cognición se logra en el plazo de 12 horas después de la administración del anticuerpo.

B. Pacientes aceptados para el tratamiento

Los pacientes aceptados para el tratamiento incluyen pacientes que presentemente muestran síntomas. En el caso de enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive suficientemente.

El principal factor de riesgo para EA es la edad elevada. A medida que la población envejece, la frecuencia de EA continúa aumentando. Los cálculos estimados actuales indican que hasta el 10% de la población por encima de la edad de 65 y hasta el 50% de la población por encima de la edad de 85 tienen EA.

Aunque es raro, ciertos individuos pueden ser identificados a una edad temprana como que están genéticamente predispuestos a desarrollar EA. Los individuos que llevan la forma heredable de EA, conocida como "EA familiar" o "EA de aparición temprana", pueden identificarse de una historia familiar bien documentada de EA, del análisis de un gen que se sabe que confiere EA cuando se muta, por ejemplo, el gen APP o presenilina. Mutaciones de APP bien caracterizadas incluyen las mutaciones "Hardy" en los codones 716 y 717 de APP770 (por ejemplo, valina⁷¹⁷ a isoleucina (Goate y col., (1991), Nature 349:704); valina⁷¹⁷ a glicina (Chartier y col. (1991) Nature 353:844; Murrell y col.(1991), Science 254:97); valina⁷¹⁷ a fenilalanina (Mullan y col.(1992), Nature Genet. 1:345-7), las mutaciones "Swedish" en el codón 670 y 671 de APP770, y la mutación "Flemish" en el codón 692 de APP770. Se cree que tales mutaciones producen enfermedad de Alzheimer por procesamiento elevado o alterado de APP a A β , particularmente procesamiento de APP para cantidades elevadas de la forma larga de A β (es decir, A β 1-42 y A β 1-43). Se cree que mutaciones en otros genes, tales como los genes presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento de APP para generar elevadas cantidades de la forma larga A β (véase Hardy, TINS 20: 154 (1997); Kowalska y col., (2004), Polish J. Pharmacol., 56: 171-8). Además de EA, mutaciones en el aminoácido 692 ó 693 de la isoforma de 770 aminoácidos de APP participa en el trastorno amiloidogénico cerebral llamado hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (HCHWA-D).

Más comúnmente, la EA no es heredada por un paciente, pero la desarrolla debido a la compleja interacción de una variedad de factores genéticos. Se dice que estos individuos tienen "EA esporádica" (también conocida como "EA de aparición tardía"), una forma que es mucho más difícil de diagnosticar. Sin embargo, la población de pacientes puede cribarse para la presencia de alelos o rasgos de susceptibilidad que no producen EA, pero que se sabe que se segregan con EA a una mayor frecuencia que en la población general, por ejemplo, los alelos ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4 de la apolipoproteína E (Corder y col. (1993), Science, 261: 921-923). En particular, los pacientes que carecen del alelo ϵ 4, preferentemente además de algún otro marcador para EA, pueden identificarse como "en riesgo" de EA. Por

ejemplo, pacientes que carecen del alelo $\epsilon 4$ que tienen parientes que tienen EA o que padecen hipercolesterolemia o aterosclerosis pueden identificarse como "en riesgo" de EA. Otro posible biomarcador es la evaluación combinada de niveles de A β 42 en líquido cefalorraquídeo (LCR) y tau. Bajo niveles de A β 42 y altos de tau tienen un valor predictivo en identificar pacientes en riesgo de EA.

Otros indicadores de pacientes en riesgo de EA incluyen datos neuropatológicos dinámicos *in vivo*, por ejemplo, detección *in vivo* de beta-amiloide en cerebro, patrones de activación cerebral, etc. Tales datos pueden obtenerse usando, por ejemplo, resonancia magnética nuclear (RMN) tridimensional, tomografía de emisión de positrones (TEP) y tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT). Los indicadores de pacientes que tienen EA probable incluyen, pero no se limitan a, pacientes (1) que tienen demencia, (2) de una edad de 40-90 años de edad, (3) déficits cognitivos, por ejemplo, en dos o más dominios cognitivos, (4) progresión de déficits durante más de seis meses, (5) consciencia inalterada, y/o (6) ausencia de otros diagnósticos razonables.

Los individuos que padecen tanto formas esporádicas como familiares de EA se diagnostican normalmente, sin embargo, tras la presentación de uno o más síntomas característicos de EA. Síntomas comunes de EA incluyen déficits cognitivos que afectan el rendimiento de las habilidades o tareas rutinarias, problemas con el lenguaje, desorientación de tiempo o sitio, poca sensatez o disminuida, alteraciones en el pensamiento abstracto, pérdida del control motor, alteración del estado de ánimo o comportamiento, cambio de personalidad o pérdida de iniciativa. Los déficits numéricos o el grado del déficit cognitivo mostrado por el paciente normalmente refleja el grado al que la enfermedad ha progresado. Por ejemplo, el paciente puede presentar solo un deterioro cognitivo leve, de forma que el paciente presenta problemas con la memoria (por ejemplo, memoria contextual), pero de otro modo puede funcionar bien.

Los presentes usos médicos también son útiles para individuos que tienen un déficit cognitivo relacionado con A β , por ejemplo, demencia relacionada con A β . En particular, los presentes usos médicos son especialmente útiles para individuos que tienen un déficit cognitivo o anomalía producida por o atribuida a la presencia de A β oligomérico soluble en el sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, en el cerebro o LCR. Los déficits cognitivos producidos por o asociados a A β también incluyen aquellos producidos por o asociados a: (1) el desarrollo de placas β -amiloides en el cerebro; (2) tasas anómalas de síntesis de A β , procesamiento, degradación o eliminación; (3) formación o actividad de especies de A β oligomérico soluble (por ejemplo, en el cerebro); y/o (4) formación de formas anómalas de A β . No es necesario establecer un enlace causativo real entre una anomalía de A β y déficit cognitivo en un paciente particular, sin embargo, algunos de los enlaces deben indicarse, por ejemplo, por uno de los marcadores anteriormente descritos de EA para distinguir pacientes que padecen déficits cognitivos no relacionados con A β que no se esperaría que se beneficiaran del tratamiento con un agente inmunoterapéutico para A β .

Se han desarrollado varias pruebas para evaluar las habilidades cognitivas o el rendimiento en sujetos humanos, por ejemplo, sujetos en riesgo de o que tienen síntomas o patología de trastornos de demencia (por ejemplo, EA). Los déficits cognitivos pueden identificarse por rendimiento alterado de estas pruebas, y se han propuesto muchos tratamientos basándose en su capacidad para mejorar el rendimiento en estas pruebas. Aunque algunas tareas han evaluado comportamiento o función motora de sujetos, la mayoría de las tareas se han diseñado para probar aprendizaje o memoria.

La cognición en seres humanos puede evaluarse usando una amplia variedad de pruebas que incluyen, pero no se limitan a, las siguientes pruebas. La ADAS-Cog (escala cognitiva para la evaluación de enfermedad de Alzheimer) es una prueba de 11 partes que dura 30 minutos. La ADAS-Cog es un breve examen preferido para el estudio de las habilidades del lenguaje y la memoria. Véanse Rosen y col. (1984) *Am J Psychiatry*. 141(11):1356-64; Ihl y col. (2000) *Neuropsychobiol*. 41(2):102-7; y Weyer y col. (1997) *Int Psychogeriatr*. 9(2):123-38.

La prueba de Blessed es otra prueba rápida (~10 minutos) de cognición que evalúa las actividades de la vida cotidiana y la memoria, concentración y orientación. Véase Blessed y col. (1968) *Br J Psychiatry* 114(512):797-811.

La batería automatizada de pruebas neuropsicológicas de Cambridge (CANTAB) se usa para la evaluación de déficits cognitivos en seres humanos con enfermedades neurodegenerativas o lesión cerebral. Consiste en trece pruebas computerizadas interrelacionadas de memoria, atención y función ejecutiva, y se administra mediante una pantalla táctil de un ordenador personal. Las pruebas son lenguaje y ampliamente libres de la cultura, y han mostrado ser altamente sensibles en la detección precoz y el cribado rutinario de enfermedad de Alzheimer. Véase Swainson y col. (2001) *Dement Geriatr Cogn Disord*.; 12:265-280; y Fray y Robbins (1996) *Neurotoxicol Teratol*, 18(4):499-504. Robbins y col. (1994) *Demencia* 5(5):266-8 1.

Las pruebas clínicas y neuropsicológicas del Consorcio para establecer un registro de enfermedad de Alzheimer (CERAD) incluyen una prueba de fluencia verbal, prueba de nombramiento de Boston, miniexamen del estado mental (MMSE), recordar palabras de diez letras, práctica constructiva y recuerdo diferido de artículos de la práctica. La prueba normalmente dura 20-30 minutos y es conveniente y eficaz en la evaluación y seguimiento del empeoramiento cognitivo. Véase Morris y col. (1988) *Psychopharmacol Bull*. 24(4):641-52; Morris y col. (1989) *Neurology* 39(9):1159-65; y Welsh y col. (1991) *Arch Neurol*. 48(3):278-81.

El miniexamen del estado mental (MMSE) desarrollado en 1975 por Folstein y col. es una breve prueba del estado mental y función de la cognición. No mide otros fenómenos mentales, y por tanto no es un sustituto de un examen mental completo. Es útil en el cribado de demencia y su sistema de puntuación es útil en el posterior progreso con el tiempo. El miniexamen del estado mental MMSE se usa ampliamente, con normas ajustadas para la edad y educación. Puede usarse para cribar el deterioro cognitivo, para estimar la gravedad del deterioro cognitivo en un momento dado de tiempo, para seguir la evolución de los cambios en un individuo con el tiempo y para documentar una respuesta del individuo a tratamiento. La evaluación cognitiva de sujetos puede requerir pruebas neuropsicológicas formales, con pruebas de seguimiento separadas nueve meses o más (en seres humanos). Véase Folstein y col. (1975) J Psychiatr Res. 12:196-198; Cockrell y Folstein (1988) Psychopharm Bull. 24(4):689-692; y Crum y col. (1993) J. Am. Med. Association 18:2386-2391.

El cribado de siete minutos es una herramienta de cribado para ayudar a identificar pacientes que deben evaluarse para enfermedad de Alzheimer. La herramienta de cribado es altamente sensible a los signos tempranos de EA, usando una serie de cuestiones para evaluar diferentes tipos de funcionalidad intelectual. La prueba consiste en 4 conjuntos de cuestiones que se basan en la orientación, memoria, habilidades visuoespaciales y lenguaje expresivo. Puede distinguir entre cambios cognitivos debidos al proceso de envejecimiento normal y déficits cognitivos debidos a demencia. Véase Solomon y Pendlebury (1998) Fam Med. 30(4):265-71, Solomon y col. (1998) Arch Neurol. 55(3):349-55.

Los individuos que presentemente 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 A β 42. Niveles elevados de tau y disminuidos de A β 42 significan la presencia de EA. Los individuos que padecen enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse por criterios de ADRDA como se trata en la sección de ejemplos.

C. Pautas de tratamiento y dosificaciones

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o 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 reactivo reduce o elimina el deterioro miocognitivo en pacientes que todavía no han desarrollado patología de Alzheimer característica. Una cantidad adecuada para realizar tratamiento terapéutico se define como una dosis terapéuticamente eficaz. En pautas terapéuticas, los reactivos 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 respuesta tal puede ser una respuesta activa, es decir, inducida por la administración de inmunogén, 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 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.

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. En otro ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0,5 mg/kg de peso corporal o 15 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 0,5-15 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. En otro ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0,5 mg/kg de peso corporal o 20 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 0,5-20 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. En otro ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0,5 mg/kg de peso corporal o 30 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 0,5-30 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. En un ejemplo preferido, las dosificaciones pueden ser aproximadamente 30 mg/kg. En un ejemplo particularmente preferido, el anticuerpo 12A11 se administra intraperitonealmente a una dosis que oscila de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg.

En ciertas realizaciones, los procedimientos de la invención comprenden la administración de un agente de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo para A β) a un sujeto como una dosis única. En otras realizaciones, los procedimientos de la invención comprenden la administración de un agente de anticuerpo (por ejemplo, un

anticuerpo para A β) a un sujeto en múltiples dosis. En una realización, la dosis de anticuerpo para A β es de aproximadamente 300 μ g/kg a 30 mg/kg de peso corporal del paciente. En todavía otra realización, la dosis de A β anticuerpo es de aproximadamente 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente.

5 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
10 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.

15 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.

25 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.

30 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.

35 Los reactivos 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 reactivos 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[™].

45 Los reactivos inmunológicos de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de enfermedad amiloidogénica. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado de la invención (por ejemplo, 12A11 humanizado) se administra en combinación con un segundo reactivo inmunogénico o inmunológico. Por ejemplo, un anticuerpo 12A11 humanizado de la invención puede administrarse en combinación con otro anticuerpo humanizado para A β . En otras realizaciones, un anticuerpo 12A11 humanizado se administra a un paciente que ha recibido o está recibiendo una vacuna de A β . 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 reactivos inmunológicos 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.

D. Composiciones farmacéuticas

60 Los reactivos inmunológicos 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
65 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.

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).

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 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 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 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.

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, 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 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 un parche cutáneo o usando transferosomas (Paul y col., Eur. J. Immunol. 25:3521 (1995); Cevc y col., Biochem. Biophys. Acta 1368:201-15 (1998)).

E. 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 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 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. 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.

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.

En otros procedimientos, un paciente que no está presentemente 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.

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.

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 periodo de días a meses dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado.

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.

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 miniexamen del estado mental según convención durante toda la evolución de tratamiento.

F. Kits

La divulgación proporciona además kits para realizar los procedimientos de monitorización descritos anteriormente. Normalmente, tales kits contienen un agente que se une específicamente a anticuerpos para A β . El kit también puede incluir una marca. Para la detección de anticuerpos para A β , la marca está normalmente en forma de anticuerpos antiidiotípicos marcados. Para la detección de anticuerpos, el agente puede suministrarse previamente unido a una fase sólida, tal como a los pocillos de una placa de microtítulo. Los kits también contienen normalmente etiquetas que proporcionan indicaciones para el uso del kit. La etiqueta también puede incluir un diagrama u otra pauta de correspondencia que correlaciona niveles de etiqueta medida con niveles de anticuerpos para A β . El término etiqueta se refiere a cualquier material escrito o grabado que está unido a, o de otro modo que acompaña, a un kit en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiqueta engloba folletos y prospectos publicitarios, materiales de embalaje, instrucciones, audio o videocasetes, discos informáticos, además de inscripciones impresas directamente sobre los kits.

La divulgación también proporciona kits de diagnóstico, por ejemplo, kits de investigación, detección y/o de diagnóstico (por ejemplo, para realizar la obtención de imágenes *in vivo*). Tales kits normalmente contienen un anticuerpo para unirse a un epítipo de A β , preferentemente dentro de los residuos 1-10. Preferentemente, el anticuerpo está marcado o un reactivo de marcado secundario se incluye en el kit. Preferentemente, el kit está etiquetado con instrucciones para realizar la aplicación prevista, por ejemplo, para realizar un ensayo de obtención de imágenes *in vivo*. Anticuerpos a modo de ejemplo son aquellos descritos en el presente documento.

G. Obtención de imágenes *in vivo*

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.

Los procedimientos funcionan administrando un reactivo, tal como anticuerpo que se une a A β , al paciente y luego detectando el agente después de que se haya unido. Anticuerpos preferidos se unen a depósitos de A β en un paciente sin unirse a polipéptido APP de longitud completa. Los anticuerpos que se unen a un epítipo de A β dentro de los aminoácidos 1-10 son particularmente preferidos. En algunos procedimientos, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 7-10 de A β . Tales anticuerpos normalmente se unen sin inducir una respuesta de eliminación sustancial. En otros procedimientos, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 1-7 de A β . Tales anticuerpos normalmente se unen e inducen una respuesta de eliminación a A β . 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. En general, los anticuerpos que se unen a epítopes del extremo C con respecto al residuo 10 de A β no muestran una señal tan fuerte como los anticuerpos que se unen a epítopes dentro de los residuos 1-10, supuestamente debido a que los epítopes del extremo C están inaccesibles en depósitos de amiloide. Por consiguiente, tales anticuerpos son menos preferidos.

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 A β 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 TEP o SPECT.

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.

H. Ensayos clínicos

Puede realizarse un ensayo de fase I de dosis única para determinar la seguridad en seres humanos. Un agente terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo de la invención) 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 alcance un nivel de aproximadamente 10 veces la dosificación eficaz en ratón.

Adicionalmente puede realizarse un ensayo de fase II para determinar la eficacia terapéutica. Se seleccionan pacientes con enfermedad de Alzheimer de temprana a media definida usando los criterios de la Asociación de la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados (ADRDA) para EA probable. Pacientes adecuados puntúan en el intervalo de 12-26 en el miniexamen de estado mental (MMSE). Otros criterios de selección son que es probable que los pacientes sobrevivan a la duración del estudio y carezcan de complicaciones 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 completa escala 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 los perfiles de sangre de pacientes, que incluyen ensayos de anticuerpos específicos de inmunógeno y respuestas de linfocitos T.

Tras las mediciones del nivel inicial, los pacientes empiezan a recibir tratamiento. Se aleatorizan y se tratan con tanto agente terapéutico como placebo en 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.

Puede realizarse un segundo ensayo de fase II para evaluar la conversión de pacientes de pérdida de memoria temprana no por enfermedad de Alzheimer, algunas veces denominado alteración de la memoria asociada a la edad (AAMI) o deterioro cognitivo leve (MCI), a enfermedad de Alzheimer probable como se define por los criterios de ADRDA. Los pacientes con alto riesgo de conversión a 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 la sintomatología pre-Alzheimer, una historia familiar de enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genéticos, edad, sexo y otros rasgos encontrados que predicen alto riesgo de 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 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.

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

EJEMPLOS

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 VL	Secuencia de aminoácidos VL	Secuencia de Nucleótidos VH	Secuencia de aminoácidos VH
12A11	SEQ ID NO:1 (codificación)	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3 (codificación)	SEQ ID NO:4
12A11v1	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:10
12A11v2	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:7		SEQ ID NO:13
12A11v2.1	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:7		SEQ ID NO:14
12A11v3	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:7		SEQ ID NO:15
12A11v3.1	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:36
12A11v4.1-8	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:7		SEQ ID NOS:16-31

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°: 1-4, 7, 10, 13-31 y 34-37 puede comprender tanto la secuencia completa como puede comprender (o codificar) la secuencia madura (es decir, péptido maduro sin el péptido señal o conductor).

Ejemplo I. Eficacia ex vivo de anticuerpo 12A11 de ratón

Estudios previos han mostrado que es posible predecir la eficacia *in vivo* de diversos anticuerpos para Aβ en reducir la neuropatología asociada a EA (por ejemplo, carga de placas) por la capacidad de anticuerpos para unirse a placas *ex vivo* (por ejemplo, en PDAPP o secciones de cerebro con EA) y/o provocar la eliminación de placas en un ensayo

de fagocitosis *ex vivo* (Bard y col. (2000) Nat. Med. 6:916-919). La correlación soporta la noción de que la fagocitosis dependiente de Fc por células de la microglía y/o macrófagos es importante para el procedimiento de eliminación de placas *in vivo*. Sin embargo, también se ha informado que la eficacia de anticuerpos también puede obtenerse *in vivo* por mecanismos que son independientes de interacciones de Fc (Bacskaï y col. (2002) J. Neurosci. 22:7873-7878). Los estudios han indicado que un anticuerpo dirigido contra la porción media de A β , que no puede reconocer placas de amiloide, parece que se une a A β soluble y reduce la deposición de placas (DeMattos y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:8850-8855). Con el fin de caracterizar la posible eficacia *in vivo* del anticuerpo monoclonal murino 12A11 (isotipo IgG1), primero se realizaron diversos ensayos *ex vivo*.

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

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

Tabla 2

Anticuerpo	Epítipo	Isotipo	ED ₅₀ de agregados A β 1-42, pM	%Captura de soluble A β 1-42
10D5†	A β 3-7	IgG1	53	1
12B4†	A β 3-7	IgG2a	667	8
12A11	A β 3-7	IgG1	233	30

† Los anticuerpos 10D5 y 12B4 se describen en detalle en el documento WO 02/46237 y la patente internacional Solicitude n° de serie PCT/U503/07715, respectivamente.
 * A modo de comparación, el anticuerpo 266 a 10 mg / ml captaría 70% de A β 1-42.

Todos los anticuerpos probados presentaron una alta avidéz para A β 1-42 agregada. Además, los anticuerpos 12B4 y 12A11 capturaron apreciablemente A β 1-42 soluble a concentraciones de anticuerpo de 20 μ g/ml. Como se muestra en la Tabla 2, el anticuerpo IgG1 12A11 capturó A β 1-42 más eficientemente que el anticuerpo IgG2a 12B4 o el anticuerpo IgG1 10D5.

La capacidad de diversos anticuerpos (incluyendo 12A11) para capturar A β soluble se ensayó adicionalmente del siguiente modo. Se incubaron diversas concentraciones de anticuerpo (hasta 10 μ g/ml) con 50.000 cpm de [125 I]-A β 1-42 (o [125 I]-A β 1-40). La concentración de anticuerpo suficiente para unir el 25% de los recuentos radiactivos se determinó en un radioinmunoensayo de captura. Para los anticuerpos que no pueden unirse al 25% de los recuentos a 10 μ g/ml se determinó el porcentaje de recuentos unidos a 10 μ g/ml. 12A11 se unió al 20% de los recuentos radiactivos (es decir, [125 I]-A β) a 10 μ g/ml. Esto fue mayor que la cantidad unida por otros dos anticuerpos para A β 3-7 probados, concretamente 12B4 y 10D5 (unión del 7% y 2% a 10 μ g/ml, respectivamente). Así, de los anticuerpos del extremo N (epítipo A β 3-7) probados, 12A11 presentó la capacidad más apreciable para capturar A β .

Como medida de su capacidad para provocar la eliminación de placas mediadas por Fc, los anticuerpos también se compararon en un ensayo de fagocitosis *ex vivo* con células primarias de la microglía de ratón y secciones de tejido cerebral de ratones PDAPP. Anticuerpos IgG1 e IgG2a irrelevantes, que no tienen reactividad hacia A β u otros componentes del ensayo, se usaron como controles negativos del mismo isotipo. Brevemente, se cultivaron células primarias de la microglía murinas con secciones de criostato sin fijar de cerebro de ratón PDAPP en presencia de anticuerpos. Después de 24 h de incubación, el nivel total de A β restante en los cultivos se midió por ELISA. Para cuantificar el grado de eliminación de placas/degradación de A β , A β se extrajo de cultivos de microglía y secciones de cerebro ($n = 3$) con urea 8 M para análisis de ELISA. Los datos se analizaron con ANOVA seguido de una prueba de Dunnett a posteriori.

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

Ejemplo II. Eficacia *in vivo* de anticuerpo 12A11 de ratón: Reducción de neuropatología de EA

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

El nivel de distrofia neurítica se examinó entonces en secciones de tejido cerebral de los ratones anteriormente mencionados para determinar la asociación entre eliminación de placas y protección neuronal. Los datos del análisis de imágenes del cerebro que examinan el porcentaje de la corteza frontal ocupada por distrofia neurítica se muestran en la Figura 2B. Estos datos muestran que los anticuerpos 10D5 y 12A11 no fueron eficaces en la reducción de distrofia neurítica, mientras que 12B4 redujo significativamente la distrofia neurítica (12B4, $P < 0,05$; ANOVA seguido de prueba de Dunnett a posteriori), como se ha determinado por el ensayo descrito en el presente documento. De nuevo, esta actividad de 12A11 puede mejorarse convirtiendo 12A11 en el isotipo IgG2a (eficacia murina). Con referencia a versiones humanizadas de 12A11, los isotipos IgG1 se prefieren para reducir la distrofia neurítica.

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

En resumen, todos los anticuerpos tuvieron avidez significativa para A β agregada y provocaron la eliminación de placas en un ensayo *ex vivo*. El isotipo IgG2a (afinidad por receptores de Fc, en particular, Fc γ RI) parece ser un tributo importante para tanto la eliminación de A β como la protección contra distrofia neurítica. El anticuerpo 12A11 (IgG1) capturó A β ₁₋₄₂ monomérico soluble más eficientemente que 12B4 (IgG2a) o 10D5 (IgG1), pero no fue tan eficaz en la reducción de distrofia neurítica. La eficacia potenciada en reducir la carga de placas y reducir la distrofia neurítica puede lograrse manipulando anticuerpos para que tengan un isotipo que soporte máximamente la fagocitosis. Anticuerpos particularmente eficaces se unen a epítopes dentro del extremo N de A β .

En otro estudio, un anticuerpo 12A11 de isotipo IgG2a se probó para la capacidad para reducir neuropatología similar a EA en ratones PDAPP. Ratones PDAPP de 12-13 meses de edad se inyectaron semanalmente durante 6 meses con 3 mg/kg de anticuerpo 12A11. Al final de los seis meses, los animales se sacrificaron y se analizaron muestras de cerebro para diversos criterios de valoración que incluyeron carga de A β , carga neurítica y niveles de sinaptofisina. La administración de anticuerpo 12A11 redujo significativamente el nivel de carga de amiloide en muestras de cerebro de PDAPP. La administración de anticuerpos 12A11 también redujo significativamente el grado de distrofia neurítica (placas que rodean procesos neuronales anómalos). Además, la administración de 12A11 protegió significativamente contra la pérdida de sinaptofisina (medida de integridad sináptica).

Ejemplo III. Eficacia *in vitro* de un anticuerpo 12A11 de ratón en un ensayo bioquímico de unión a oligómeros de A β

Este ejemplo demuestra la capacidad de diversos anticuerpos para A β para unirse preferencialmente a A β oligomérico soluble. Los datos se usan para predecir la eficacia terapéutica de los anticuerpos para A β .

En este ejemplo, la preparación de A β se preparó a partir de A β sintético sustancialmente del siguiente modo:

- (1) se disolvió péptido A β ₁₋₄₂ liofilizado a 1 mM con 100% de hexafluoroisopropanol (HFIP) helado (se removió con vórtex, luego se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora) y se separó en alícuotas en microtubos de centrífuga (conteniendo cada tubo 0,5 mg de péptido A β ₁₋₄₂);
- (2) el HFIP se eliminó mediante evaporación seguido de liofilización para eliminar HFIP residual;
- (3) la película/residuo de péptido A β resultante se guardó, desecada, a -20 °C;
- (4) el residuo de péptido A β se resuspendió en DMSO a una concentración final de 5 mM de péptido, luego se añadió a medio de cultivo Ham's F-12 helado (libre de rojo fenol) para llevar el péptido a una concentración final de 100 μ M;
- (5) el péptido se incubó a 4 °C durante 24 h para producir oligómeros de A β sintéticos a una concentración de aproximadamente 100 μ M; y
- (6) los oligómeros A β sintéticos se trataron con peroxinitrito.

Alícuotas de la preparación de A β se pusieron entonces cada una en contacto con un reactivo inmunológico de prueba, en este caso anticuerpos, y los monómeros de A β y uno o más oligómeros de A β que se unieron al reactivo inmunológico de prueba se extrajeron de la preparación de A β por inmunoprecipitación. Los diversos inmunoprecipitados se separaron por electroforesis en gel y se inmunotransfirieron (se obtuvieron imágenes) con el anticuerpo 3D6 sustancialmente del siguiente modo. Las muestras de inmunoprecipitado de las Figuras 3-4 se diluyeron en tampón de muestra y se separaron por SDS-PAGE sobre un gel de 16% de tricina. La proteína se

transfirió a membranas de nitrocelulosa, las membranas se hirvieron en PBS y luego se bloquearon durante la noche a 4 °C en una disolución de TBS/Tween/5% de leche evaporada Carnation. Las membranas se incubaron entonces con 3D6, un anticuerpo para A β monoclonal de ratón para los residuos 1-5. Para la detección, las membranas se incubaron con anti-Ig de ratón-HRP, se revelaron usando ECL Plus™ y se visualizaron usando película. La masa molecular se estimó por marcadores de peso molecular SeeBlue Plus2™.

Las Figuras 3-4 representan los resultados de poner en contacto las preparaciones de A β ₁₋₄₂ anteriores con diversos reactivos inmunológicos de prueba (en las Figuras 3-4 anticuerpos para A β) para determinar la unión de, por ejemplo, monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros de A β , etc., en la preparación de A β al reactivo inmunológico de prueba. Las Figuras 3-4 representan transferencias Western (obtención de imágenes con 3D6) de inmunoprecipitados de una preparación de A β oligomérico tratada con peroxinitrito puesta en contacto con diversos anticuerpos para A β . Las posiciones aproximadas de las bandas de monómero, dímero, trímero y tetrámero de A β ₁₋₄₂ se indican en el lado izquierdo de cada figura. Debajo de cada anticuerpo para A β se indica el epítipo de A β reconocido por el anticuerpo y los resultados del ensayo de CFC (véase el Ejemplo V, arriba) para el anticuerpo, una notación "+" indica una observación de elevada cognición tras el tratamiento con el anticuerpo, una notación "-" indica una observación de no cambio en la cognición tras el tratamiento con el anticuerpo, una notación "+/-" indica una observación de una tendencia de cognición elevada tras el tratamiento con el anticuerpo, pero que no es suficientemente estadísticamente significativa para indicarse como una observación de cognición elevada, y la notación "ND" indica datos de ensayo de CFC no disponibles o comparados para este anticuerpo.

En las Figuras 3-4, un aumento de la unión de un anticuerpo para A β para dímeros de A β u oligómeros de mayor orden en la preparación de A β , con respecto a la unión del anticuerpo para A β para monómeros de A β en la preparación de A β , predice que el anticuerpo para A β tiene eficacia terapéutica para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer. En particular, los anticuerpos para A β 3D6, 15C11, 10D5, 12A11 y 266 presentaron unión preferencial por especies de A β oligoméricas con respecto a A β monomérico, presentando 12A11 la unión preferencial más significativa a A β oligomérico. Por consiguiente, se predice que estos anticuerpos tienen eficacia terapéutica en el tratamiento de déficits cognitivos, por ejemplo, aquellos asociados a EA.

Líneas celulares que producen los anticuerpos 10D5 y 3D6, que tienen los números de acceso de **ATCC** PTA-5129 y PTA-5130, respectivamente, se depositaron el 8 de abril de 2003, bajo los términos del Tratado de Budapest.

Ejemplo IV. Eficacia *in vivo* de un anticuerpo 12A11 de ratón: Rápida mejora en la cognición en el ratón Tg2576

Ratones naturales y ratones Tg2576 se administraron con una dosis única de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o anticuerpo de tratamiento por inyección intraperitoneal. Para evaluar cualquier mejora rápida en la cognición (es decir, memoria contextual y dependiente de pistas), a cada ratón se le administró una sesión de entrenamiento de CFC inmediatamente tras el tratamiento y una sesión de entrenamiento de CFC en el plazo de 24 horas desde el tratamiento (es decir, día 1 después del tratamiento). La eficacia terapéutica se expresó tanto en términos de inversión del déficit de memoria como estado de alteración de la memoria. La inversión del "déficit de memoria" se determinó comparando el comportamiento de congelación de animales Tg2576 tratados con mAb frente a control de PBS. El "estado de alteración de la memoria" se determinó comparando el comportamiento de congelación de animales Tg2576 naturales frente a tratados con mAb.

La eficacia terapéutica de varios mAb producidos contra el extremo N de A β se tabulan en la Tabla 3. Los resultados de la sesión de prueba de CFC realizada en el día 1 después del tratamiento indican que los mAb 3D6, 10D5 y 12A11 provocaron una mejora rápida y significativa (**) en la memoria contextual de ratones Tg2576 con respecto a un tratamiento de control (valor de $p < 0,05$). Además, ratones Tg2576 tratados con 3D6, 10D5 y 12A11 no tuvieron alteración significativa de la memoria (##) con respecto a ratones naturales (valor de $p > 0,1$). Adicionalmente, los anticuerpos 6C6, 10D5 y 12B4 mostraron una tendencia hacia la afectación de tanto la inversión del déficit de memoria (*) como la no alteración de la memoria (#) ($0,1 > \text{valor de } p > 0,05$).

Los ratones Tg2576 expresaron una mejora particularmente importante, significativa y rápida en la memoria contextual cuando se administraron con el mAb IgG2a murino del extremo N designado 12A11. Por ejemplo, 12A11 produjo una inversión del déficit de memoria a cada dosis probada (0,3, 1, 10 ó 30 mg/kg) [véanse las Figuras 5A y 5B]. A diferencia, los ratones Tg2576 sin tratar (PBS) mostraron un déficit significativo en la memoria dependiente de contextual (*) en comparación con ratones naturales [Figura 5A]. Sin embargo, los ratones Tg2576 presentaron una inversión del déficit de memoria completa y significativa (#) cuando se les administró 1, 10 ó 30 mg/kg (i.p.) de 12A11. La mejora en el rendimiento cognitivo persistió cuando a los ratones se les administraron dosis menores (0,1 y 1 mg/kg i.p.) de 12A11 [Figura 5B].

Para confirmar que la respuesta observada fue debida a la unión a amiloide, a los ratones Tg2576 se les administraron 30 mg/kg de mAb de control de isotipo IgG2a producido contra un antígeno sin relacionar de *E. tennela*. Como era de esperar, los ratones Tg2576 tratados con el anticuerpo de control presentaron profundos defectos en la memoria contextual en relación con los ratones naturales.

Tabla 3: Efecto de mAb para A β del extremo N en la memoria contextual de ratones Tg2576

Déficit de memoria, Reversión por Ab dosis (mg / kg) (p valor WRT PBS control)						
mAb prueba	Epítipo	0.3	1	3	10	30
3D6	1-5	ND	ND	0.3680	0.1586	0.0004**
6C6-1	3-7	ND	ND	ND	ND	0.0588*
6C6-2	3-7	ND	ND	ND	ND	0.6567
10D5	3-6	ND	ND	0.7045	0.9661	0.0189**
2H3	2-7	ND	ND	ND	ND	0.3007
12B4-1	3-7	ND	ND	ND	ND	0.1122
12B4-2	3-7	ND	ND	ND	ND	0.1015
12A11-1	3-7	ND	0.02**	ND	0.0002**	0.0007**
12A11-2	3-7	0.0055**	0.001**	ND	ND	ND
Estado de deterioro por Ab dosis (mg / kg) (p valor WRT ratones WT)						
mAb prueba	Epítipo	0.3	1	3	10	30
3D6	1-5	ND	ND	0.0529#	0.2585##	0.8972##
6C6-1	3-7	ND	ND	ND	ND	0.0056
6C6-2	3-7	ND	ND	ND	ND	0.0088
10D5	3-6	ND	ND	0.0009	0.002	0.0752#
2H3	2-7	ND	ND	ND	ND	0.1333##
12B4-1	3-7	ND	ND	ND	ND	0.0013
12B4-2	3-7	ND	ND	ND	ND	0.756#
12A11-1	3-7	ND	0.9092##	ND	0.3838##	0.9901##
12A11-2	3-7	0.3341##	0.7773##	ND	ND	ND
* Tablero 1 (-1) y el guión 2 (-2) indican dos diferentes animales probados.						

Ejemplo V. Eficacia *in vivo* de un anticuerpo 12A11 de ratón: Mejora prolongada en la cognición de un ratón Tg2576

La duración de las mejoras cognitivas que se observaron en el plazo de 24 horas tras el tratamiento con el anticuerpo 12A11 murino del extremo N ("mu12A11") se evaluó en un segundo estudio de CFC prolongado. Ratones Tg2576 y naturales se administraron de nuevo con un control de PBS o una dosis baja de anticuerpo 12A11 (1 mg/kg ip) y su estado cognitivo se evaluó por ensayo de CFC en el día 0-1, 9-10 y 16-17 después del tratamiento (es decir, con las sesiones de entrenamiento de CFC realizadas en los días 0, 9, 16 y las sesiones de prueba de CFC realizadas en los días 1, 10 y 17).

Como se describe en el Ejemplo IV, los ratones Tg2576 mostraron de nuevo mejora importante, significativa y rápida en la memoria contextual en el día 1 tras el tratamiento con mu12A11 [véase la *Figura 6*]. Por ejemplo, Tg2576 tratados con mu12A11 presentaron una inversión del déficit de memoria significativa (cuando se comparan con ratones Tg2576 tratados con PBS) y estado de alteración de la memoria que se aproximó a la igualdad con el de ratones naturales. Estas mejoras en la memoria contextual persistieron y fueron incluso más pronunciadas cuando se evaluaron en el día 10 después del tratamiento. Además, cuando se evaluaron en el día 17 después del tratamiento, mu12A11 continuó mostrando una tendencia hacia la no alteración de la memoria. Estos resultados indicaron que una única dosis de anticuerpo del extremo N mu12A11 puede producir una mejora duradera y prolongada en el rendimiento cognitivo del modelo de ratón de EA.

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

Clonación y análisis de secuencias de VH de mu12A11. Las regiones VH y VL de 12A11 de células de hibridoma se clonaron por RT-PCR y 5' RACE usando ARNm de células de hibridoma y metodología de clonación convencional. La secuencia de nucleótidos (codificante, SEC ID N°: 3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 4) derivada de clones de ADNc independientes que codifican el supuesto dominio VH de mu12A11, se exponen en la Tabla 6 y la Tabla 7, respectivamente (véase también la *Figura 7A*).

Tabla 6: Secuencia de ADN de VH de 12A11 de ratón

ATGGACAGGCTTACTACTTCATTCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCTT
 5 GTCCCAAGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGAAGCCCTCACAG
 ACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCTACTGAGCACTTCTGGTAT
 GAGTGTAGGCTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGC
 10 ACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGG
 CTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTATTCCTCAAGATCACCA
 GTGTGGACACTGCAGATACTGCCACTTACTACTGTGCTCGAAGAACTACTAC
 15 GGCTGACTACTTTGCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 (SEQ ID NO:3)

Tabla 7: Secuencia de aminoácidos de VH de 12A11 de ratón

mdrlttsfllivpayvlsQVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLStsgmsvgWIRQPSGKG
 25 LEWLAhiwwdddkyynpslksRLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARrtttadyfa
 yWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO: 4)

* Péptido conductor y CDR en minúscula.

Clonación y análisis de secuencias de VL de 12A11. La región VL variable de la cadena ligera de 12A11 se clonó de un modo análogo a la región VH. La secuencia de nucleótidos (codificante, SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 2) derivada de dos clones de ADNc independientes que codifican el supuesto dominio VL de 12A11 se exponen en la Tabla 8 y la Tabla 9, respectivamente (véase también la Figura 7B).

Tabla 8: Secuencia de ADN de VL de 12A11 de ratón

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAG
 40 CAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAG
 ATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGG
 45 AAACACCTACTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCT
 CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGT
 50 GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT
 GAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAAGTTCACATGTTCTCTCACGTT
 55 CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:1)

Tabla 9: Secuencia de aminoácidos de VL de 12A11 de ratón

mklpvrllvmfwipasssDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCrssqsvhsngntileWILQKPGQ
 60 SPKLLIYkvsnrfsGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCfqsshvplTFGAGTK LELK (SEC ID N°: 2)

* Péptido conductor y CDR en minúscula.

Las secuencias de VL y VH de 12A11 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.

Ejemplo VII: Expresión de anticuerpo 12A11 quimérico

Expresión de anticuerpo 12A11 quimérico: 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 (SEC ID N°: 57 y 58) y pCMV-hκ1 (SEC ID N°: 59 y 60) para la cadena ligera (véase, por ejemplo, Maeda y col. (1991) Hum. Antibod. Hybridomas. 2:124-134). 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. Los anticuerpos se inmunoprecipitaron a partir de medios acondicionados de células COS usando proteína A-Sepharose. Las cadenas de anticuerpos se detectaron sobre inmunotransferencias de geles de SDS-PAGE. La detección se llevó a cabo usando anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H+L) a una dilución 1:5000 a temperatura ambiente durante 1 hora. Se detectaron cantidades significativas de cadena de H+L de 12A11 en medios acondicionados.

La unión directa de anticuerpo 12A11 quimérico para Aβ se probó por ensayo de ELISA. La *Figura 8* demuestra que se encontró que 12A11 quimérico se unía a Aβ con alta avidez, similar a la demostrada por 3D6 quimérico y humanizado (la clonación, caracterización y humanización de 3D6 se describe en el documento US 2005/0090648). La avidez de unión también fue similar a la demostrada por 12B4 quimérico y humanizado (la clonación, caracterización y humanización de 12B4 se describe en el documento US 2004/082 762).

Ejemplo VIII. Humanización de 12A11

A. Anticuerpo humanizado 12A11, versión 1

Análisis de homología / modelo molecular. Con el fin de identificar residuos estructurales clave de la región estructural en el anticuerpo 12A11 murino, se estudiaron modelos tridimensionales para anticuerpos murinos resueltos que tienen homología con las cadenas pesadas y ligeras de 12A11. Se eligió un anticuerpo designado 1KTR que tenía estrecha homología con la cadena ligera de 12A11 y se eligieron dos anticuerpos designados 1ETZ y 1JRH que tenían estrecha homología con la cadena pesada de 12A11. Estos anticuerpos de ratón muestran una fuerte conservación de secuencias con 12A11 (94% de identidad en 112 aminoácidos para Vk y 83% de identidad en 126 aminoácidos y 86% de identidad en 121 aminoácidos respectivamente para Vh). La estructura de la cadena pesada de 1ETZ se superpuso sobre la de 1KTR. Además, para Vk los bucles de CDR del anticuerpo seleccionado se encuentran en las mismas clases estructurales de Chothia canónicas que los bucles de CDR de VL de 12A11. Las estructuras cristalinas de estos anticuerpos examinadas para residuos (por ejemplo, residuos FR importantes para la conformación de CDR, etc.) predijeron ser importantes para la función del anticuerpo, y por comparación, la función del anticuerpo 12A11 similar.

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 12A11. 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 Ig NCBI 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/o (3) no contener ningún residuo de aminoácido raro en las regiones estructurales. La secuencia aceptora seleccionada para VL es BAC01733 en la base de datos no redundante de Ig NCBI. La secuencia aceptora seleccionada para VH es AAA69734 en la base de datos no redundante de Ig NCBI. AAA69734 es un anticuerpo del subgrupo III humano (en vez del subgrupo II), pero se seleccionó como un anticuerpo aceptor inicial basado al menos en parte en el razonamiento en Saldanha y col. (1999) Mol. Immunol. 36:709. Las primeras versiones del anticuerpo 12A11 humanizado utilizan estas secuenciasceptoras seleccionadas de anticuerpos. El anticuerpo se describe en Schroeder y Wang (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6146.

Sustitución de residuos de aminoácidos. Como se observa arriba, 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 12A11. Habiendo identificado las regiones determinantes de la complementariedad de 12A11 e inmunoglobulinasceptoras 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.

Región V de la cadena ligera reestructurada:

- 5 El alineamiento de aminoácidos de la región V de la cadena ligera reestructurada se muestra en la *Figura 9A*. La elección de la región estructural aceptora (BAC01733) es del mismo subgrupo humano que la que se corresponde con la región V murina, no tiene residuos raros de la región estructural y las CDR pertenecen a los mismos grupos de estructura canónica de Chothia. No se hicieron retromutaciones en la versión 1 de 12A11 humanizado.

10 Región V de la cadena pesada reestructurada:

- 15 El alineamiento de aminoácidos de la región V de la cadena pesada reestructurada se muestra en la *Figura 9B*. La elección de la región estructural aceptora (AAA69734) es del subgrupo III humano (como se ha descrito previamente) y no tiene residuos raros de la región estructural. El análisis estructural de la cadena de VH murina (1ETZ y 1JRH), conjuntamente con el alineamiento de aminoácidos de AAA69734 con la secuencia murina, indica 9 retromutaciones en la versión 1 (v1) de la cadena pesada reestructurada: A24F T28S F29L V37I V48L F67L R71K N73T L78V (numeración de Kabat). Las retromutaciones están marcadas por asteriscos en el alineamiento de aminoácidos mostrado en la *Figura 9B*.

- 20 De las 9 retromutaciones, 3 están indicadas por el modelo debido a que los residuos son residuos canónicos (A24F, F29L y R71K, relleno continuo), es decir, residuos de la región estructural que pueden contribuir a la unión a antígeno en virtud de la proximidad a residuos de CDR. Hay una retromutación en la siguiente clase de residuos más importante, los residuos de interfase implicados en las interacciones de compactación de VH-VL (subrayadas), es decir, V37I. La mutación N73T está en un residuo de vernier (relleno discontinuo) sobre el borde del sitio de unión, interaccionando posiblemente con S30 adyacente a CDR1. Los 4 residuos restantes elegidos como diana para la retromutación (T28S, V48L, F67L, L78V, numeración de Kabat) también se encuentran en la clase de vernier (contribución indirecta a la conformación de CDR, relleno discontinuo en la *Figura 9B*).

Un resumen de los cambios incorporados en la versión 1 de 12A11 humanizado se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de cambios en 12A11.v1 humanizado

Cambios	VL (112 residuos)	VH (120 residuos)
Hu->Mu: Estructura	0/112	9/120
CDR1	5/16	6/7
CDR2	3/7	10/16
CDR3	6/8	8/11
Total Hu->Mu	14/112 (12.5%)	33/120 (27.5%)
Mu->Hu: Estructura	11/112	26/120
Notas de Retromutación	ninguna	1. Canónico: A24F, F29L, R71K 2. Envasado: V37I 3. Vernier: T28S, V48L, F67L, N73T, L78V
Notas aceptador	4. Genbank Acc. no. BAC01733 5. CDR del mismo grupo estructural canónico como ratón donante 6. Cadena ligera kappa de inmunoglobulina K64(AIMS4)	7. Genbank Acc. no. AAA69734 (H1 – clase 1, H2 = clase 3) 8. CDR del mismo grupo estructural canónico como ratón donante 9. Ig fetal

- 50 Las Tablas 11 y 12 exponen claves de numeración de Kabat para las diversas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Tabla 11: Clave para la numeración de Kabat para la cadena ligera de 12A11

KAB #	#	TIPO	Ratón 12A11 VL	HUM 12A11 VL	BAC 01733	A19-Línea germen	Comentario
1	1	FR1	D	D	D	D	
2	2		V	V	V	I	Canónico
3	3		L	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	Vernier
5	5		T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	
7	7		T	S	S	S	

ES 2 434 732 T3

(Continúa)

	KAB #	#	TIPO	Ratón 12A11 VL	HUM 12A11 VL	BAC 01733	A19-Línea germen	Comentario
5	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	
10	13	13		V	V	V	V	
	14	14			T	T	T	
	15	15		L	P	P	P	
	16	16		G	G	G	G	
	17	17			E	E	E	
15	18	18		Q	P	P	P	
	19	19		A	A	A	A	
	20	20		S	S	S	S	
	21	21		I	I	I	I	
	22	22		S	S	S	S	
20	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	
25	27 A	28		S	S	S	S	
	27B	29		I	I	L	L	
	27C	30		V	V	L	L	
	27D	31		H	H	H	H	
30	27E	32		S	S	S	S	
	28	33		N	N	N	N	
	29	34		G	G	G	G	
	30	35		N	N	Y	Y	
	31	36		T	T	N	N	
35	32	37		Y	Y	Y	Y	
	33	38		L	L	L	L	
	34	39		E	E	D	D	
40	35	40	FR2	W	W	W	W	Envasado
	36	41		Y	Y	Y	Y	
	37	42		L	L	L	L	Envasado
	38	43		Q	Q	Q	Q	
	39	44		K	K	K	K	
45	40	45		P	P	P	P	Vernier
	41	46		G	G	G	G	
	42	47		Q	Q	Q	Q	
	43	48		S	S	S	S	
	44	49		P	P	P	P	Envasado
50	45	50		K	Q	Q	Q	
	46	51		L	L	L	L	Envasado
	47	52		L	L	L	L	Vernier
	48	53		I	I	I	I	Canónico
	49	54		Y	Y	Y	Y	Vernier
55								
	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	
60	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	
65	59	64		P	P	P	P	

ES 2 434 732 T3

(Continúa)

KAB #	#	TIPO	Ratón 12A11 VL	HUM 12A11 VL	BAC 01733	A19-Línea germen	Comentario
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	Canónico
65	70		S	S	S	S	
66	71		G	G	G	G	Vernier
67	72		S	S	S	S	
68	73		G	G	G	G	Vernier
69	74		T	T	T	T	Venier
70	75		D	D	D	D	
71	76		F	F	F	F	Canónico
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	
82	87		D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	
85	90		I	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	Envasado
88	93		C	C	C	C	
89	94	CDR3	F	F	M	M	
90	95		Q	Q	Q	Q	
91	96		S	S	A	A	
92	97		S	S	L	L	
93	98		H	H	Q	Q	
94	99		V	V	T	T	
95	100		P	P	P	P	
96	101		L	L	Y		
97	102		T	T	T		
98	103	FR4	F	F	F		Envasado
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		

60

65

Tabla 12. Clave para la numeración de Kabat para la cadena pesada de 12A11

	KAB#	#	TIPO	Ratón 12A11VH	HUM 12A11VHv1	AAA 69734	567123 Línea- Germen	Comentario
5	1	1	FR1	Q	Q	Q	Q	
	2	2		V	V	V	V	Vernier
	3	3		T	Q	Q	Q	
	4	4		L	L	L	L	
10	5	5		K	V	V	V	
	6	6		E	E	E	E	
	7	7		S	S	S	S	
	8	8		G	G	G	G	
15	9	9		P	G	G	G	
	10	10		G	G	G	G	
	11	11		I	V	V	V	
	12	12		L	V	V	V	
	13	13		K	Q	Q	Q	
20	14	14		P	P	P	P	
	15	15		S	G	G	G	
	16	16		Q	R	R	R	
	17	17		T	S	S	S	
	18	18		L	L	L	L	
25	19	19		S	R	R	R	
	20	20		L	L	L	L	
	21	21		T	S	S	S	
	22	22		C	C	C	C	
	23	23		S	A	A	A	
30	24	24		F	F	A	A	Canónico para H1 – Retromutación en v1
	25	25		S	S	S	S	
35	26	26		G	G	G	G	Canónico
	27	27		F	F	F	F	Canónico
	28	28		S	S	T	T	Vernier, cerrado a H1- Retromutación en v1
40	29	29		L	L	F	F	Canónico para H1 – Retromutación en v1
45	30	30		S	S	S	S	
	31	31	CDR1	T	T	S	S	
	32	32		S	S	Y	Y	
	33	33		G	G	A	A	
50	34	34		M	M	M	M	
	35	35		S	S	H	H	
	35A	36		V	V	-	-	
	35B	37		G	G	-	-	
	36	38	FR2	W	W	W	W	
55	37	39		I	I	V	V	Envasado- retromutación en v1
	38	40		R	R	R	R	
60	39	41		Q	Q	Q	Q	Envasado
	40	42		P	A	A	A	
	41	43		S	P	P	P	
	42	44		G	G	G	G	
	43	45		K	K	K	K	
65	44	46		G	G	G	G	

ES 2 434 732 T3

(Continúa)

KAB#	#	TIPO	Ratón 12A11VH	HUM 12A11VHv1	AAA 69734	567123 Línea- Germen	Comentario
45	47		L	L	L	L	Envasado
46	48		E	E	E	E	
47	49		W	W	W	W	Envasado
48	50		L	L	V	V	Vernier (por debajo de H2) - Retromutación en v1
49	51		A	A	A	A	
50	52	CDR2	H	H	V	V	
51	53		I	I	I	I	
52	54		W	W	S	S	
53	55		W	W	Y	Y	
54	56		D	D	D	D	
55	57		-	-	S	S	
56	58		D	D	N	N	
57	59		K	K	K	K	
58	60		Y	Y	Y	Y	
59	61		Y	Y	Y	Y	
60	62		N	N	A	A	
61	63		P	P	D	D	
62	64		S	S	S	S	
63	65		L	L	V	V	
64 66			K	K	K	K	
65	67		S	S	G	G	
66	68	FR3	R	R	R	R	
67	69		L	L	F	F	Vernier (por debajo de H", posibilidad de interactuac con L63) – Retromutación en v1
68	70		T	T	T	T	
69	71		I	I	I	I	
70	72		S	S	S	S	
71	73		K	K	R	R	Canónico para H2 – Retromutación en v1
72	74		D	D	D	D	
73	75		T	T	N	N	Vernier (borde del sitio de unión, posibilidad de interactuar con S30) – Retromutación en v1
74	76		S	S	S	S	
75	77		R	K	K	K	
76	78		N	N	N	N	
77	79		Q	T	T	T	

(Continúa)

KAB#	#	TIPO	Ratón 12A11VH	HUM 12A11VHv1	AAA 69734	567123 Línea- Germen	Comentario
78	80		V	V	L	L	Vernier (enterrado bajo H1, posibilidad de interactuac con V35A)- retromutación en v1
79	81		F	Y	Y	Y	
81	82		L	L	L	L	
82	84		I	M	M	M	
82A	85		T	N	N	N	
82B	86		S	S	S	S	
82C	87		V	L	L	L	
83	88		D	R	R	R	
84	89		T	A	A	A	
85	90		A	E	E	E	
86	91		D	D	D	D	
87	92		T	T	T	T	
88	93		A	A	A	A	
89	94		T	V	V	V	
90	95		Y	Y	Y	Y	
91	96		Y	Y	Y	Y	Envasado
92	97		C	C	C	C	
93	98		A	A	A	A	Envasado
94	99		R	R	R	R	Canónico
95	100	CDR3	R	R	R	-	
96	101		T	T	H	-	
97	102		T	T	S	-	
98	103		T	T	S	-	
99	104		A	A	S	A	
100	105		D	D	W	K	
100A	106		Y	Y	Y	L	
100B	107		F	F	Y	L	
101	108		A	A	G	M	
102	109		Y	Y	M	L	
			-	-	D	L	
			-	-	V	I	
103	110		W	W	W	S	Envasado
104	111		G	G	G	G	
105	112		Q	Q	Q	A	
106	113		G	G	G	K	
107	114	FR4	T	T	T	G	
108	115		T	T	T	Q	
109	116		L	V	V	W	
110	117		T	T	T	S	
111	118		V	V	V	P	
112	119		S	S	S	S	
113	120		S	S	S	L	

Los anticuerpos humanizados presentan preferentemente una afinidad de unión específica por A β de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 ó 10^{10} M⁻¹. Normalmente, el límite superior de afinidad de unión de los anticuerpos humanizados para A β está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco el de 12A11 (es decir, $\sim 10^9$ M⁻¹). Frecuentemente, el límite inferior de la afinidad de unión también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco el de 12A11.

Ensamblaje y expresión de VH y VL de 12A11 humanizado, versión 1

Se usó ensamblaje mediado por PCR para generar h12A11v1 usando cebadores de oligonucleótidos apropiados. Las secuencias de nucleótidos de VL de 12A11 humanizado (versión 1) (SEC ID N°: 34) y VH de 12A11 (versión 1) (SEC ID N°: 35) se enumeran a continuación en las Tablas 13 y 14, respectivamente.

Tabla 13. Secuencia de nucleótidos de 12A11VLv1 humanizado

atgaggctccctgctcagctcctggggctgctgatgctctgggtctctgggtccagtgggGATGTTGTGAT
GACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCCTGGAGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGA
GCATTGTGCATAGTAATGGAAACACCTACCTGGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTC
CTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGA
TTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAAGTTTACATG
TTCCTCTCACCTTCGGTTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 34)

(segmento de VL en mayúsculas solo) péptido conductor codificado por la sec de la línea germinal de A19 derivada del péptido conductor x63397

Tabla 14. Secuencia de nucleótidos de 12A11VHv1 humanizado

atggagtttgggctgagctgggttttccctcggttgctcttctgagaggtgtccagtgtCAAGTTCAGCTGGT
GGAGTCTGGCGGCGGGTGGTGCAGCCCGGACGGTCCCTCAGGCTGTCTTGTGCTTTCTCTGGGTTTTCAC
TGAGCACTTCTGGTATGAGTGTGGGCTGGATTTCGTCAAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACAC
ATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTC
CAAAAACACCGTGTACCTCCAGATGAACAGTCTGCGGGCTGAAGATACTGCCGTGTACTACTGTGCTCGAA
GAATACTACCGTGTACTACTTTGCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTGTCTACAGTCTCCTCA (SEQ ID
NO: 35)

Péptido conductor (minúscula) derivado de la sec donante de VH acceso M34030.1/aaa69734/M72

Las secuencias de aminoácidos de 12A11VL humanizado (versión 1) (SEC ID N°: 7) y 12A11VH (versión 1) (SEC ID N°: 10) se representan en las Figuras 9A y 9B, respectivamente.

B. Anticuerpos 12A11 humanizados - Versiones 2.2.1 y 3

Los residuos de vernier (por ejemplo, S28T, V48L, F67L, L78V) contribuyen indirectamente a la conformación de CDR y se propuso que eran de menos significancia para la perturbación conformacional. Los residuos elegidos como diana se mutaron por mutagénesis dirigida a sitio usando un kit por Strategene y h12A11VHv1 en un plásmido pCRS como molde de mutagénesis para producir los clones correspondientes a la versión 2. Un inserto de la región V verificado por secuencia de versión 2 se subclonó en los sitios BamHI/HindIII del vector de expresión de la cadena pesada pCMV-Cgamma1 (SEC ID N°: 57 y 58) para producir anticuerpo h12A11v2 recombinante. Se creó similarmente un anticuerpo versión 2.1 teniendo cada uno de los anteriores mutaciones de residuos de vernier (es decir, eliminación de retromutaciones), además de mutación en la posición T73N. Asimismo, un anticuerpo de versión 3 tuvo cada una de las mutaciones anteriores, T28S, L48V, L67F, V78L, además de una mutación en la posición K71R. Las secuencias de aminoácidos de 12A11VH humanizado (versión 2) (SEC ID N°: 13), 12A11VH (versión 2.1) (SEC ID N°: 14) y 12A11VH (versión 3) (SEC ID N°: 15) se representan en las Figuras 10A-C.

C. Anticuerpos 12A11 humanizados - Versiones 4 a 6

Se diseñaron versiones de 12A11 humanizado adicionales que retuvieron retromutaciones en residuos canónicos y de compactación, pero eliminaron retromutaciones en uno (versiones 4.1 a 4.4), dos (versiones 5.1 a 5.6) o tres (versiones 6.1 a 6.4) residuos de vernier. La mutagénesis dirigida a sitio y la construcción de clones se realizó como se describe en el subapartado C, anteriormente. Los anticuerpos recombinantes se expresaron en células COS y se purificaron a partir de sobrenadantes de células de COS. Versiones adicionales pueden incluir combinaciones de las anteriores, por ejemplo, residuos humanos en 1, 2, 3, 4 ó 5 residuos de vernier en combinación con al menos un residuo de compactación y/o canónico (por ejemplo, residuos humanos en las posiciones 28, 37, 48, 67, 71 y 78 o residuos humanos en las posiciones 28, 37, 48, 67, 71, 73 y 78). Por ejemplo, se creó un anticuerpo de versión 3.1 que tiene residuos humanos en 1 residuo de vernier en combinación con un residuo de compactación y dos residuos canónicos (es decir, residuos humanos en las posiciones 28, 48, 67, 71, 73 y 78). Con respecto a la versión 1 que tiene 21% de residuos de la región variable de ratón (VL + VH), la versión 3.1 solo tiene el 17% de residuos de la región variable de ratón (es decir, tiene un contenido murino menor). Las secuencias de aminoácidos de 12A11VH humanizado (versión 3.1) (SEC ID N°: 36) y versiones 4-6 de 12A11VH humanizado (SEC ID N°: 16-29) se representan en las Figuras 10A-C.

D. Anticuerpos 12A11 humanizados - Versiones 7 y 8

Se crea una séptima versión de 12A11 humanizado que tiene cada una de las retromutaciones indicadas para la

versión 1, excepto la retromutación T→ S en el residuo 28 (vernier) y la retromutación V→ I en el residuo 37 (compactación). Se crea una octava versión de 12A11 humanizado que tiene cada una de las retromutaciones indicadas para la versión 1, excepto la retromutación N→ T en el residuo 73 (vernier). Las secuencias de aminoácidos de VH de 12A11 humanizado (versión 7) (SEC ID N°: 30) y VH de 12A11 humanizado (versión 8) (SEC ID N°: 16-31) se representan en las Figuras 10A-C.

Con respecto a la versión 1, la versión 7 contiene solo 7 retromutaciones. La retromutación T28S es conservativa y se elimina en la versión 7 de la cadena pesada. La retromutación en el residuo de compactación V37I también se elimina en la versión 7. Con respecto a la versión 1, la versión 7 solo contiene 8 retromutaciones. En la versión 8, la retromutación N73T (vernier) se elimina.

Versiones adicionales pueden incluir combinaciones de las anteriores, por ejemplo, residuos humanos (por ejemplo, eliminación de retromutaciones) en 1, 2, 3, 4 (o 5) residuos seleccionados de las posiciones 28, 48, 78 y 73, opcionalmente en combinación con eliminación de retromutación de al menos un residuo de compactación (por ejemplo, posición 37) y/o al menos un residuo canónico.

Ejemplo IX: Prueba funcional de anticuerpos 12A11 humanizados

Todas las versiones humanizadas de 12A11 se clonaron en un sistema de expresión pSMED2/pSMEN2. La secuencia codificante para cada anticuerpo se ligó operativamente a una secuencia conductora de la línea germinal para facilitar la secreción extracelular. 12A11 humanizado se expresó transitoriamente en células COS para la producción de cantidades analíticas de anticuerpo usado en las pruebas funcionales descritas más adelante. Líneas celulares CHO y HEK293 se transfectaron posteriormente y se transfirieron a cultivo en suspensión para proporcionar la expresión estable de niveles de producción de anticuerpo para su uso *in vivo*. En particular, los mayores niveles de expresión transitoria se obtuvieron con construcciones de expresión que codifican los anticuerpos 12A11 humanizados hu 12A11.v1 y 12A11.v3.1. La expresión de h12A11v3.1 en células COS transitoriamente transfectadas aumentó por manipulación de intrones de las cadenas pesadas. En algunos experimentos, la expresión de h12A11v3.1 en un conjunto establemente transfectado aumentó por manipulación del contenido de intrones de las cadenas pesadas (es decir, delección de intrones entre CH1 y la región bisagra, intrón entre la región bisagra y CH2, e intrón entre CH2 y CH3) y secuencia señal (es decir, uso de la secuencia señal genérica MGWSCIIILFLVATGAHS (SEC ID N°: 56). Todos los anticuerpos humanizados se purificaron según metodologías reconocidas en la materia.

La actividad de unión de los anticuerpos humanizados se demostró primero por un ensayo de ELISA cualitativo (datos no mostrados). 12A11 humanizado versión 1 se comparó adicionalmente con sus homólogos murinos y quiméricos para dos propiedades: unión a antígeno (ELISA de Aβ cuantitativo) y afinidad relativa. La actividad de unión de h12A11v1 se demostró en el ELISA de Aβ cuantitativo y se encontró que era idéntica a la de las formas murinas y quiméricas de 12A11 (véase la Figura 11).

La afinidad del anticuerpo h12A11v1 también se comparó con anticuerpos 12A11 murinos y quiméricos por un ELISA de Aβ competitivo. Para el ensayo de unión competitiva se usó 12A11Cγ2a de ratón recombinante conjugado con biotina (12A11 de isotipo cambiado). La actividad de unión del m12A11Cγ2a biotinilado para agregar Aβ 1-42 se confirmó por un ensayo de ELISA usando estreptavidina-HRP como indicador. Una comparación directa de la unión de Aβ por las dos isoformas de 12A11 (Cγ1, Cγ2a), usando anticuerpo de cabra anti-HRP de ratón conjugado con HRP como indicador, confirmó que 12A11Cγ2a recombinante conjugado con biotina es comparable al anticuerpo de ratón Cγ1 original.

El estudio de unión por competencia empleó m12A11 Cγ2a conjugado con biotina a una concentración fija y compitió con un intervalo de concentraciones de anticuerpos de prueba como se indica en la Figura 12. La Figura 12 muestra el resultado del ensayo competitivo de h12A11v1 comparando h12A11v1 con formas quiméricas y murinas. 12A11v1 humanizado compitió dentro de 2X valor de CI₅₀ con sus homólogos murinos y quiméricos. Estos datos están de acuerdo con la determinación de afinidad usando tecnología Biacore (datos no mostrados), que indicó valores de KD de 38 nM y 23 nM para Cγ2a y h12A11v1 murino, respectivamente. En resumen, los hallazgos sugieren que h12A11v1 retiene las propiedades de unión a antígeno y la afinidad de su homólogo murino original.

Se transfectaron transitoriamente células COS con diferentes combinaciones de 12A11VH humanizado y h12A11VLv1. El medio acondicionado se recogió 72 horas después de la transfección. La concentración de anticuerpo en medio condicionado de células COS transfectadas se determinó por un ELISA de IgG humana cuantitativo. El ensayo cuantitativo de unión a agregados de Aβ (1-42) confirmó que h2A11v2, v2.1 y v3 son comparables a h12A11v1 y 12A11 quimérico para la unión a antígeno. Además, las versiones 5.1-5.6 y 6.1-6.3 presentan actividades de unión similares cuando se prueban en este ensayo de unión. La versión 6.4 mostró alguna pérdida de actividad en el ensayo, pero la actividad se restauró notablemente en v2.

También se compararon las propiedades de unión para 12A11 y h12A11v1 murino usando tecnología Biacore. 12A11 y h12A11v1 murinos presentaron perfiles de unión similares cuando se expusieron a tanto péptido Aβ

inmovilizado de baja como de alta densidad (péptido bio-DAE). También se realizó el análisis cinético de 12A11 murino frente a h12A11v1. En estos estudios, la tecnología BIAcore se usó para medir la unión de anticuerpo soluble a péptido DAE biotinilado unido a fase sólida. El péptido se inmovilizó luego sobre chips biosensores de estreptavidina, se aplicaron concentraciones variables de cada anticuerpo por triplicado y la unión se midió en función del tiempo. Los datos cinéticos se analizaron usando el software BIAevaluation aplicado a un modelo bivalente. Las constantes de velocidad de disociación (k_d) y asociación (k_a) aparentes se calcularon a partir de las regiones apropiadas de los sensogramas usando un análisis global. La constante de afinidad de la interacción entre bio-DAE10 y los anticuerpos se calculó a partir de las constantes de velocidad cinéticas. A partir de estas mediciones, las constantes de velocidad de disociación (k_d) y asociación (k_a) aparentes se derivaron y se usaron para calcular un valor de K_D para la interacción. La Tabla 15 incluye un resumen del análisis cinético de la unión de A β de anticuerpos 12A11 como se ha determinado por el análisis BIAcore.

Tabla 15:

Modelo bivalente (análisis global)					
Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_A (1/M)	K_D (nM)	Chi2
m12A11	1.05E+05	3.98E-03	2.64E+07	38.00	0.247
h12A11v1	1.47E+05	3.43E-03	4.29E+07	23.30	0.145

Los datos indican que 12A11 v1 humanizado tiene una afinidad similar por el péptido A β cuando se compara con 12A11 murino parental.

En otro experimento se compararon las propiedades cinéticas de 12A11 v1, v2, v2.1, v3 y v3.1 humanizado. La Tabla 16 incluye un resumen del análisis cinético de la unión de A β de los diversos anticuerpos 12A11 humanizados (como se ha determinado por el análisis BIAcore).

Tabla 16: Propiedades de unión de anticuerpos 12A11

Modelo de Langmuir (análisis global)					
Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_A (1/M)	K_D (nM)	Chi2
mu12A11	5.28E+05	1.65E-03	3.21E+08	3.12	1.71
chi12A11	4.89E+05	1.54E-03	3.17E+08	3.15	2.26
h12A11v1	4.08E+05	1.17E-03	3.48E+08	2.87	8.01
h12A11v2	2.83E+05	4.12E-03	6.86E+07	14.6	0.96
h12A11v2.1	3.06E+05	2.61E-03	1.17E+08	8.54	0.88
h12A11v3	3.59E+05	5.50E-03	6.53E+07	15.3	0.90
h12A11v3.1	5.23E+05	3.13E-03	1.67E+08	5.99	1.10

Los datos indican que 12A11 v1 humanizado y 12A11 v3.1 humanizado tienen afinidades similares por el péptido A β cuando se comparan con 12A11 murino parental (h12A11v1 > m12A11 > chi12A11 > h12A11v3.1 > h12A11v2.1 > h12A11v2 > h12A11v3.1). En particular, la afinidad de 12A11 v1 humanizado y 12A11 v3.1 humanizado están dentro de 2-3x la del anticuerpo 12A11 quimérico como se ha determinado por unión competitiva y/o el análisis BIAcore.

Se observaron resultados similares en los estudios de unión por competencia realizados como se ha descrito anteriormente (véase la *Figura 13*). En particular, la restauración de la retromutación en el residuo de vernier 48 en VH (V48L) aumenta la afinidad de h12A11v3.1 a próxima a la de h12A11v1.

12A11 v1 humanizado y 12A11 v3 humanizado se probaron adicionalmente para la capacidad para unir placa y para eliminar placas en un ensayo *ex vivo*. Se realizó inmunohistoquímica sobre secciones de criostato de cerebros de PDAPP y de EA humana. 12A11 v1 humanizado y 12A11 v3 humanizado se compararon con 12A11 quimérico y se encontró que se tiñó la placa en tanto secciones de PDAPP como de criostato humanas a todas las concentraciones probadas (es decir, 0,3 μ g/ml, 1 μ g/ml y 3 μ g/ml). Como una medida de su capacidad para provocar la eliminación de placas mediada por Fc, 12A11 v1 humanizado y 12A11 v3 humanizado también se probaron en un ensayo de fagocitosis *ex vivo* con células primarias de microglía de ratón y secciones de tejido cerebral de ratones PDAPP para su capacidad para eliminar placa. Se usó anticuerpo IgG1 irrelevante, que no tiene reactividad hacia A β u otros componentes del ensayo, como control negativo. Cada uno de los anticuerpos 12A11 v1 humanizado, 12A11 v3 humanizado y 12A11 quimérico redujeron eficazmente los niveles de A β cuando se probaron a una concentración de 0,3 μ g/ml (datos no mostrados).

La especificidad de unión de 12A11 quimérico, 12A11 v1 humanizado y 12A11 v3 humanizado se compararon por análisis de NET de sustitución (rNET) del siguiente modo. Brevemente, se realizó un ensayo de mapas de epítopes de rNET para proporcionar información sobre la contribución de residuos individuales dentro de un epítipo del extremo N de A β a la actividad de unión global de los anticuerpos probados. El análisis de rNET usa análogos de péptidos sustituidos individuales sistemáticos sintetizados. La unión de 12A11 de ratón se determinó contra un péptido correspondiente a los 10 aminoácidos del extremo N de A β (antígeno "nativo") y contra 19 péptidos "sustituidos individuales" alternativos, estando cada péptido sustituido en una primera posición con uno de los 19

aminoácidos no nativos para esa la posición. Se generó un perfil que refleja el efecto de la sustitución con los diversos residuos no nativos en esa posición sobre la actividad de unión (determinada por ELISA de captura). Los perfiles se generaron asimismo en posiciones sucesivas (8 residuos en total) a lo largo del péptido antigénico. El perfil combinado, o mapa de epítopes (que refleja la sustitución en cada posición con los 19 residuos no nativos) se comparó entonces con mapas similarmente generados para 12A11 quimérico, 12A11 v1 humanizado y 12A11 v3.1 humanizado. En particular, la especificidad de 12A11 v1 humanizado y 12A11 v3.1 humanizado fueron las mismas o similares a las del anticuerpo 12A11 murino parental.

Ejemplo X. Eficacia *in vivo* de un anticuerpo humanizado 12A11: Rápida mejora en la cognición de un ratón Tg2576

La eficacia terapéutica del anticuerpo 12A11 murino (mu12A11), 12A11 quimérico (qui12A11) y una forma humanizada de 12A11 (v3.1 hu12A11) se compararon en un ensayo de CFC. Como en el Ejemplo IV, tanto ratones naturales como Tg2576 se administraron con una dosis única de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o anticuerpo de tratamiento por inyección intraperitoneal.

Para evaluar cualquier mejora rápida en la cognición (es decir, memoria contextual y dependiente de pistas), a cada ratón se le administró una sesión de entrenamiento de CFC inmediatamente tras el tratamiento y una sesión de entrenamiento de CFC en el plazo de 24 horas desde el tratamiento (es decir, día 1 después del tratamiento). Los resultados del ensayo de CFC se representan en la *Figura 14*. Los datos indican claramente que mu12A11, qui12A11 y v3.1 hu12A11 tienen una potencia similar en la cognición que mejora rápidamente. Por ejemplo, una dosis de 3 mg/kg o mayor de tanto qui12A11 como v3.1 hu12A11 produjo una inversión del déficit de memoria que fue similar en magnitud a los resultados obtenidos con una dosis de 1 mg/kg de mu12A11. Los anticuerpos humanizados 12A11 v1.0 a v3.1 también demostraron eficacia en los ensayos de CFC, en particular, v1.0, v3.0 y v3.1, teniendo v1.0 y v3.1 eficacia similar a la de 12A11 murino, y presentando v3.0 adicionalmente eficacia significativa. Además, h12A11 v1.0 fue eficaz en el ensayo de CFC cuando se probaron ratones con EA doblemente transgénicos (MED=3 mg/kg), que indica que la eficacia de anticuerpo pasivamente administrado no se valoró debido a la unión a placa en estos ratones. El anticuerpo 266 de ratón (que no se une a placa) se incluyó como control positivo (MED=3 mg/kg).

La capacidad de un anticuerpo h12A11 v3.0 de isotipo IgG también se probó en CFC y demostró que era eficaz a MED 0,1 mg/kg. El cambio de isotipo demostró tener una actividad mediada por Fc enormemente reducida (pero no eliminada), que indica que la eficacia no es únicamente dependiente de la función de Fc.

De lo anterior será evidente que la divulgación proporciona varios usos. Por ejemplo, la divulgación proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos para Aβ descritos anteriormente en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de un enfermedad o trastorno relacionado con Aβ, o una enfermedad o trastorno amiloidogénico, o en la fabricación de un medicamento o composición de diagnóstico para su uso en la misma.

LISTADO DE SECUENCIAS

110> Wyeth y Neuralab et al.

<120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS ABeta PARA USO EN LA MEJORA DE COGNICIÓN

<130> ELN-060PC

<150> 60/636776

<151> 2004-12-15

<160> 60

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 393

<212> ADN

<213> Murina

<220>

<221> CDS

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

<220>

<221> sig_peptido

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

ES 2 434 732 T3

<400> 1

5	atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct	48
	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
	-15 -10 -5	
10	tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc	96
	Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val	
	1 5 10	
15	agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att	144
	Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile	
	15 20 25	
20	gta cat agt aat gga aac acc tac tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca	192
	Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
	30 35 40 45	
25	ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct	240
	Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
	50 55 60	
30	ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
	65 70 75	
35	ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc	336
	Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys	
	80 85 90	
40	ttt caa agt tca cat gtt cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg	384
	Phe Gln Ser Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu	
	95 100 105	
45	gag ctg aaa	393
	Glu Leu Lys	
	110	

<210> 2

45 <211> 131
<212> PRT
<213> Murina

<220>

50 <221> SEÑAL
<222> (1)...(19)

<400> 2

55

60

65

[illegible]

25

- <210> 3
- <211> 417
- <212> ADN
- <213> Murina

30

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(417)

35 <220>
<221> sig_peptido
<222> (1)...(57)

 $\langle 400 \rangle$ 3

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

-15 -10 -5

45 gtc ttg tcc caa gtt act cta aaa gag tct ggc cct ggg ata ttg aag 96
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys
 1 5 10

50 ccc tca cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg 144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu

 15 20 25

55 agc act tct ggt atg agt gta ggc tgg att cgt cag cct tca ggg aag 192
 Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 30 35 40 45

ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tgg tgg gat gat gat aag tac tat 240

	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	
					50					55					60		
5	aac	cca	tcc	ctg	aag	agc	cgg	ctc	aca	atc	tcc	aag	gat	acc	tcc	aga	288
	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Arg	
				65				70					75				
10	aac	cag	gta	ttc	ctc	aag	atc	acc	agt	gtg	gac	act	gca	gat	act	gcc	336
	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	
			80					85					90				
15	act	tac	tac	tgt	gct	cga	aga	act	act	acg	gct	gac	tac	ttt	gcc	tac	384
	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	
		95					100					105					
20	tgg	ggc	caa	ggc	acc	act	ctc	aca	gtc	tcc	tca						417
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser						
	110					115					120						
25	<210> 4																
	<211> 139																
	<212> PRT																
	<213> Murina																
30	<220>																
	<221> SEÑAL																
	<222> (1) ... (19)																
	<400> 4																
35	Met	Asp	Arg	Leu	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Leu	Leu	Ile	Val	Pro	Ala	Tyr	
					-15					-10					-5		
	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Lys	
				1				5					10				
40	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	
		15					20					25					
	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	
	30					35					40					45	
	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	
					50				55						60		
45	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Arg	
				65				70					75				
	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	
			80					85					90				
50	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	
		95					100					105					
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser						
	110					115					120						
55	<210> 5																
	<211> 429																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia Artificial																
60	<220>																
	<223> construcción sintética																
	<400> 5																
65																	

cmgmaagctt gccgccacca tgaagttgcc tgtaggctg ttgggtgctga tgttctggat 60
 tcctgcttcc agcagtgatg ttttgatgac ccaaactcca ctctccctgc ctgtcagtct 120
 tggagatcaa gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc attgtacata gtaatggaaa 180
 5 cacctactta gaatgggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccaaagctcc tgatctacaa 240
 agtttccaac cgattttctg ggggtcccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga 300
 tttcacactc aagatcagca gagtggaggg tgaggatctg ggaatttatt actgctttca 360
 aagttcacat gttcctctca cgttcgggtgc tgggaccaag ctggagctga aacgtgagtg 420
 10 **gatcctmgr** 429
 <210> 6
 <211> 445
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 20 <400> 6
 aagcttgccg ccaccatgga caggcttact acttcattcc tgctgctgat tgtccctgca 60
 tatgtcttgt cccaagttac tctaaaagag tctggccctg ggatattgaa gccctcacag 120
 accctcagtc tgacttggtc tttctctggg ttttactga gcacttctgg tatgagtgtg 180
 25 ggctggattc gtcagccttc aggggaagggt ctggagtggc tggcacacat ttgggtggg 240
 gatgataagt actataaccc atccctgaag agccgggtca caatctccaa ggatacctcc 300
 agaaaccagg tattcctcaa gatcaccagt gtggacactg cagatactgc cacttactac 360
 tgtgctcgaa gaactactac ggctgactac tttgcctact ggggccaaagg caccactctc 420
 30 acagtctcct caggtgagtg gatcc 445
 <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v1, VL región
 40 <400> 7
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 45 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 50 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 55 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 8
 60 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 65 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(22)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

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

35

<400> 9

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

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, h12A11v1, VH región

65 <400> 10

1 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 10 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 15 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 20 115 120

<210> 11
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(19)

30 <400> 11
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 35 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 40 Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 45 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 50 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Gly Met
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

55 <210> 12
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (19)
 <400> 12

65

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

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética, h12A11v2

<400> 13

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

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética, h12A11v2.1

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v3

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

50 <210> 16
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v4.1

60 <400> 16

65

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 15 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 20 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v4.2

 <400> 17

 35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 40 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 45 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 50 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 55 <210> 18
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v4.3

 <400> 18

 65

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 15 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 20 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v4.4
 <400> 19
 35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 40 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 45 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 50 <210> 20
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v5.1
 <400> 20
 60
 65

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

<210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> construcción sintética, h12A11v5.2

<400> 21

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

<210> 22
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> construcción sintética, h12A11v5.3

<400> 22

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120
5	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg									
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser									
				20					25					30											
	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu									
			35					40					45												
10	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser									
		50					55					60													
	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu									
		65				70					75														
15	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr									
				85						90															
	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln									
				100					105																
20	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Val																
			115						120																
	<210>	23																							
	<211>	121																							
	<212>	PRT																							
	<213>	Secuencia Artificial																							
25																									
	<220>																								
	<223>	construcción sintética, h12A11v5.4																							
	<400>	23																							
30	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg									
	1				5					10					15										

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

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v5.6

30 <400> 25

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

50 <210> 26
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> construcción sintética, h12A116.1

60 <400> 26

65

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 15 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 20 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 27
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v6.2

 <400> 27

 35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 40 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 45 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 50 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 55 <210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v6.3

 <400> 28

 65

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 10 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 15 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 20
 <210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v6.4
 30
 <400> 29
 35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 40 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 45 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 50
 <210> 30
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v7
 60
 <400> 30
 65

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

<210> 31
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> construcción sintética, h12A11v8
 30 <400> 31

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

<210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> construcción sintética, región de bisagra Igg
 60 <400> 32

Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5

65

```
<210> 33
<211> 5
<212> PRT
```

5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> construcción sintética, región de bisagra Igg

<400> 33

10 Leu Glu Gly Gly Pro
1 5

<210> 34
<211> 396
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética, secuencia 12A11 v1 VL humanizada

```
<220>  
<221> sig_péptido  
<222> (1)...(60)
```

25
<400> 34

	atgaggctcc	ctgctcagct	cctggggctg	ctgatgctct	gggtctctgg	ctccagtggg	60
	gatgttgta	tgacccaatc	tccactctcc	ctgcctgtca	ctcctggaga	gccagcctcc	120
30	atctcttgca	gatctagtca	gagcattgtg	catagtaatg	gaaacaccta	cctggaatgg	180
	tacctgcaga	aaccaggcca	gtctccacag	ctcctgatct	acaaagtttc	caaccgattt	240
	tctggggctc	cagacagggt	cagtggcagt	ggatcaggga	cagatttcac	actcaagatc	300
	agcagagtgg	aggctgagga	tgtgggagtt	tattactgct	ttcaaagttc	acatgtttcct	360
35	ctcaccttcg	gtcaggggac	caagctggag	atcaaa			396

<210> 35
<211> 417
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética, secuencia 12A11 v1 VH humanizada

<220>
<221> sig_péptido
<222> (1)...(57)

<400> 35

50	atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgcctctc	tgagaggtgt	ccagtgtcaa	60
	gttcagctgg	tggagtctgg	cggcggggtg	gtgcagcccg	gacgggccct	caggctgtct	120
	tgtgctttct	ctgggttttc	actgagcact	tctggtatga	gtgtgggctg	gattcgtcag	180
	gctccaggga	agggctctgga	gtggctggca	cacatttggt	gggatgatga	taagtactat	240
55	aacccatccc	tgaagagccg	gctcacaatc	tccaaggata	cctccaaaaa	caccgtgtac	300
	ctccagatga	acagtctgcg	ggctgaagat	actgccgtgt	actactgtgc	tcgaagaact	360
	actaccgctg	actactttgc	ctactggggc	caaggcacca	ctgtcacagt	ctcctca	417

```
<210> 36
<211> 120
<212> PRT
```

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> construcción sintética, humanizada 12A11 v3.1 VH

<400> 36

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

<210> 37

<211> 417

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, secuencia 12A11 v3.1 VH humanizada

<220>

<221> sig_peptido

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

<400> 37

40 atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttc tgagaggtgt ccagtgtcaa 60
gttcagctgg tggagtctgg cggcgggggtg gtgcagcccg gacggtcctt caggctgtct 120
45 tgtgctttct ctgggttCAC actgagcact tctggtatga gtgtgggctg gattcgtcag 180
gctccaggga agggctctgga gtggctggca cacatttggt gggatgatga taagtactat 240
aaccatccc tgaagagccg ATTcacaatc tcCAGggaCA Actccaaaaa cacGCTgtac 300
50 ctccagatga acagtctgcg ggctgaagat actgccgtgt actactgtgc tcgaagaact 360
actaccgctg actactttgc ctactggggc caaggcacca ctgtcacagt ctctca 417

<210> 38

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, secuencia de consenso para la cadena kappa

<400> 38

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

<210> 39

<211> 114

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, secuencia de consenso para la cadena kappa

25

<400> 39

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

<210> 40

<211> 110

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, secuencia de consenso para la cadena kappa

55 <400> 40

60

65

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

<210> 41

<211> 115

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, secuencia de consenso para la cadena kappa

25 <400> 41

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

50 <210> 42

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> construcción sintética, secuencia de consenso para la cadena lambda

<400> 42

60

65

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

<210> 43

<211> 110

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, secuencia de consenso para la cadena lambda

25 <400> 43

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

45 <210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> construcción sintética, secuencia de consenso para la cadena lambda

<400> 44

55

60

65

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

<210> 45

20 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> construcción sintética, secuencia consenso para región de estructura de cadena pesada

<400> 45

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

<210> 46

50 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> construcción sintética, secuencia consenso para región de estructura de cadena pesada

<400> 46

60

65

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

$\langle 211 \rangle$ 121

<213> Secuencia Artificial

<223> construcción sintética, secuencia consenso para región de estructura de cadena pesada

30 <400> 47

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

$\langle 211 \rangle$ 120

<213> Secuencia Artificial

<223> construcción sintética, secuencia consenso para región de estructura de cadena pesada

60 <400> 48

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

<210> 49
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética, secuencia consenso para región de estructura de cadena pesada

<400> 49

[illegible]

<210> 50
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética, secuencia consenso para región de estructura de cadena pesada

<400> 50

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

<210> 51
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> construcción sintética, secuencia consenso para región de estructura de cadena pesada
 30 <400> 51

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

<210> 52
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> construcción sintética, cadena pesada variable de 12A11v.1 unido a Fc porción de un isitipo IgG1
 <400> 52

60

65

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
	1				5				10						15	
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
				20					25					30		
	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
			35					40					45			
	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55						60				
10	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val
	65					70					75					80
	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
					85					90					95	
15	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115						120				125			
20	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130						135					140				
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
25	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
					165					170					175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
30	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210						215					220				
35	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235				240	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
					245					250					255	
40	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
45	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	290						295					300				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
50	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu

55

60

65

ES 2 434 732 T3

					325					330					335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
5	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
10	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405					410					415	
15	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440					445			
20	Gly	Lys														
		450														

<210> 53

<211> 447

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética, cadena pesada variable de 12A11v.1 unido al Fc porción de un isotipo IgG4

<400> 53

35

40

45

50

55

60

65

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
	1				5				10						15	
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
				20					25					30		
	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
			35					40					45			
	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
10		50				55						60				
	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val
	65					70					75					80
	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
					85					90					95	
15	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125			
20	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
		130				135						140				
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
25	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
					165					170					175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
30	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
			195				200					205				
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
35		210					215				220					
	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
	225					230					235					240
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
40					245					250					255	
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
				260					265					270		
	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
45			275				280						285			

50

55

60

65

	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
		290					295					300				
5	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
	305					310					315					320
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
					325					330					335	
10	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
				340					345						350	
	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
			355					360					365			
15	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
		370					375					380				
	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
	385					390					395					400
20	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405						410					415	
	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				420				425					430			
25	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	
			435					440					445			

<210> 54

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> construcción sintética, cadena pesada variable de 12A11v3.1
unida a IgG1 región constante

35

<400> 54

40

45

50

55

60

65

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
	1				5				10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser
				20					25					30		
	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40						45			
10	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55						60				
	Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
	65				70					75						80
15	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85						90					95	
	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115						120				125			
20	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130						135					140				
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
25	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165						170					175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
30	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195				200						205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
35	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245						250					255	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
40	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
45	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325						330					335	
50	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
55	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
60	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405						410					415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440					445			
65	Gly	Lys														
		450														

<210> 55
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> construcción sintética, cadena pesada variable de 12A11v3.1 unida a IgG4 región constante

<400> 55

10	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
	1				5				10						15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser
15				20					25					30		
	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35						40					45			
	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55						60				
20	Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
	65					70					75					80
	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85						90					95	
25	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105						110	
	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly
			115						120				125			
30	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe
	130						135					140				
	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg
	145					150					155					160
35	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp
				165					170						175	
	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser
			180						185					190		
40	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg
		195						200					205			
	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala
	210						215					220				
45	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	225					230					235					240

50

55

60

65

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
245 250 255
5 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
260 265 270
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
275 280 285
10 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
290 295 300
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
305 310 315 320
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
325 330 335
15 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
340 345 350
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
355 360 365
20
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
370 375 380
25 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
385 390 395 400
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
405 410 415
30 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
420 425 430
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
435 440 445
35 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
450 455 460
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
465 470 475 480
40 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
485 490 495
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
500 505 510
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
515 520 525
45 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
530 535 540
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
545 550 555 560
50 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
565

<210> 56

<211> 17

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, secuencia de señal genérica

60

<400> 56

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Gly Ala His
1 5 10 15
65 Ser

ES 2 434 732 T3

<210> 57
 <211> 993
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> construcción sintética, Región constante de cadena pesada de ADN (solo codones)

<400> 57

10

```
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
15 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
aaatcttggt acaaaactca cacatgccc cagtgtccc cactgaact cttgggggga 360
ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
20 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
25 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga 993
```

30

<210> 58
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> construcción sintética, Región constante de cadena pesada de proteínas (solo codones)

<400> 58

40

45

50

55

60

65

	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1				5					10					15	
5	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
10	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70					75				80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
15	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				100					105					110		
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120					125			
20	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130					135					140				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
					150						155				160	
25	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170					175	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				180					185					190		
30	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195					200					205			
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
35	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
		225				230					235				240	
	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250					255	
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260					265					270		
40	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275					280					285			
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
45																
		290					295					300				
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
		305					310					315				320
50	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325						330						

<210> 59

<211> 324

<212> DNA

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética, Región constante de cadena ligera de ADN (solo codones)

60 <400> 59

65

5 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac cttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttggtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

10 <210> 60
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> construcción sintética, Región constante de cadena ligera de proteína
 <400> 60

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

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo 12A11 monoclonal, quimérico o humanizado que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID N°: 2, y CDR1, CDR2 y CDR3 de SEC ID N°: 4, en el que las CDR son como se definen por Kabat, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en efectuar mejora en la cognición en un sujeto que tiene un trastorno cognitivo relacionado con A β o un trastorno de demencia relacionado con A β en el plazo de 24 horas después de la administración al sujeto,
 5 en el que dicho anticuerpo 12A11 monoclonal, quimérico o humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a A β con una constante de disociación (kD) de 10^{-7} M o menos como se ha determinado por el procedimiento cinético BIACORE y
 10 en el que el anticuerpo 12A11 monoclonal, quimérico o humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra a una dosis de 300 μ g/kg a 30 mg/kg de peso corporal del sujeto.
2. El anticuerpo 12A11 monoclonal, quimérico o humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para uso de la reivindicación 1, que se une específicamente a A β con una constante de disociación (kD) de 10^{-8} M o menos.
3. El anticuerpo 12A11 monoclonal, quimérico o humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para uso de la reivindicación 1, que se une específicamente a A β con una constante de disociación (kD) de 10^{-9} M o menos.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene enfermedad de Alzheimer.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el sujeto es humano.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo se administra a una dosis de 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del sujeto.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un anticuerpo 12A11 quimérico o fragmento de unión a antígeno del mismo.
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo 12A11 quimérico comprende una secuencia de la región variable como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, y secuencias de la región constante de una inmunoglobulina humana.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un anticuerpo 12A11 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende:
 - (a) una cadena ligera que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 12A11 murina expuesta en SEC ID N°: 2, y (ii) una región estructural variable de una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina aceptora humana; o
 - (b) una cadena ligera que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 12A11 murina como se expone en SEC ID N°: 2, y (ii) una región estructural variable de una secuencia de la cadena ligera de la 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 de la inmunoglobulina 12A11 murina, en el que el residuo de la región estructural está seleccionado del grupo que consiste en:
 - (i) un residuo que se une no covalentemente a antígeno directamente;
 - (ii) un residuo adyacente a una CDR;
 - (iii) un residuo que interacciona con CDR; y
 - (iv) un residuo que participa en la interfase VL-VH; y
 - (c) una cadena pesada que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 12A11 murina expuesta en SEC ID N°: 4, y (ii) una región estructural variable de una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina aceptora humana; o
 - (d) una cadena pesada que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 12A11 murina como se expone en SEC ID N°: 4, y (ii) una región estructural variable de una secuencia de la cadena pesada de la 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 pesada de la inmunoglobulina 12A11 murina, en el que el residuo de la región estructural está seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (i) un residuo que se une no covalentemente a antígeno directamente;
- (ii) un residuo adyacente a una CDR;
- (iii) un residuo que interacciona con CDR; y
- (iv) un residuo que participa en la interfase VL-VH.

10 11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende:

- 15 (a) cadena ligera que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 12A11 murina expuesta como SEC ID N°: 2, y (ii) una región estructural variable de una secuencia de la cadena ligera de la 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 de 12A11 murina, 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 ha identificado por análisis de un modelo tridimensional de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 12A11; y
- 20 (b) una cadena pesada que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 12A11 murina expuesta como SEC ID N°: 4, y (ii) una región estructural variable de una cadena pesada de la 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 pesada de 12A11 murina, 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 pesada como se ha identificado por análisis de un modelo tridimensional de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 12A11.

30 12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende:

- 35 (a) cadena ligera que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 12A11 murina expuesta como SEC ID N°: 2, y (ii) una región estructural variable de una secuencia de la cadena ligera de la 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 de 12A11 murina, en el que el residuo de la región estructural está seleccionado del grupo que consiste en un residuo que puede interaccionar con antígeno, un residuo proximal al sitio de unión a antígeno, un residuo que puede interaccionar 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 compactación entre cadenas, un residuo raro y un residuo de sitio de glucosilación sobre la superficie del modelo estructural; y
- 40 (b) una cadena pesada que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 12A11 murina expuesta como SEC ID N°: 4, y (ii) una región estructural variable de una cadena pesada de la 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 pesada de 12A11 murina, en el que el residuo de la región estructural está seleccionado del grupo que consiste en un residuo que puede interaccionar con antígeno, un residuo proximal al sitio de unión a antígeno, un residuo que puede interaccionar 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 compactación entre cadenas, un residuo raro y un residuo de sitio de glucosilación sobre la superficie del modelo estructural.

55 13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende:

- 60 (a) una cadena ligera que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 12A11 murina expuesta como SEC ID N°: 2, y (ii) una región estructural variable de una cadena ligera de la inmunoglobulina aceptora humana, en el que la región está sustituida en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en la posición 2, 4, 36, 38, 40, 44, 46, 47, 48, 49, 64, 66, 68, 69, 71, 87 y 98 de la cadena ligera como se numera según Kabat; y
- 65 (b) una cadena pesada que comprende (i) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 12A11 murina expuesta como SEC ID N°: 4, y (ii) una región estructural variable de una cadena pesada de la

inmunoglobulina aceptora humana, en el que la región estructural está sustituida en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en la posición 2, 24, 26, 27, 28, 29, 37, 39, 45, 47, 48, 67, 71, 73, 78, 91, 93, 94 y 103 de la cadena pesada como se numera según Kabat.

5 14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende:

10 (a) una cadena ligera humanizada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad correspondientes del dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina 12A11 murina designado SEC ID N°: 2, y una región estructural de la región variable de una secuencia de la región estructural de la región variable de la cadena ligera humana, a condición de que al menos un residuo de la región estructural seleccionado del grupo que consiste en un residuo canónico, un residuo de vernier, un residuo de compactación y un residuo raro esté ocupado por el mismo residuo de aminoácido presente en la posición equivalente de la región estructural de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 12A11; y

15 (b) una cadena pesada humanizada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad correspondientes del dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 12A11 murina designado SEC ID N°: 4, y una región estructural de la región variable de una secuencia de la región estructural de la región variable de la cadena pesada humana, a condición de que al menos un residuo de la región estructural seleccionado de un segundo grupo que consiste en un residuo canónico, un residuo de vernier, un residuo de compactación y un residuo raro esté ocupado por el mismo residuo de aminoácido presente en la posición equivalente de la región estructural de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 12A11;

20 en el que el anticuerpo 12A11 humanizado se une específicamente a péptido beta-amiloide ("A β ") con constante de disociación (kD) de 10^{-7} M o menos,

25 en el que el anticuerpo 12A11 humanizado tiene la cadena ligera con un dominio variable designado SEC ID N°: 7 y la cadena pesada con un dominio variable designado SEC ID N°: 36.

30 15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 14, en el que la región estructural de la región variable de la cadena ligera humana es de una región variable de la cadena ligera kappa.

35 16. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 14, en el que la región estructural de la región variable de la cadena pesada humana es de una región variable de la cadena pesada de IgG1.

40 17. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 14, en el que la región estructural de la región variable de la cadena ligera es de una cadena ligera de inmunoglobulina humana que tiene al menos el 70% de identidad de secuencias con la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo 12A11 murino.

45 18. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 14, en el que la región estructural de la región variable de la cadena pesada es de una cadena pesada de inmunoglobulina humana que tiene al menos el 70% de identidad de secuencias con la secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina 12A11 murina.

50 19. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 14, en el que la cadena ligera humanizada comprende regiones determinantes de la complementariedad que son idénticas a las regiones determinantes de la complementariedad correspondientes de la cadena pesada de 12A11, y la cadena pesada humanizada comprende regiones determinantes de la complementariedad que son idénticas a las regiones determinantes de la complementariedad correspondientes de la cadena pesada de 12A11.

55 20. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de la secuencia de la cadena ligera variable 12A11 expuesta como SEC ID N°: 2.

60 21. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de la secuencia de la cadena pesada variable de 12A11 expuesta como SEC ID N°: 4.

65 22. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende una región variable que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) correspondientes a CDR de un anticuerpo 12A11 y en el que dicho anticuerpo 12A11 humanizado se une específicamente a péptido beta-amiloide (A β).

23. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo humanizado comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable expuesta como SEC ID N°: 7 y que tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste en SEC

ID N°: 10, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 36.

24. Un polipéptido aislado que comprende los aminoácidos 1-120 de SEC ID N°: 36 y SEC ID N°: 7.

5 25. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de la reivindicación 26.

26. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica los aminoácidos 1-120 de SEC ID N°: 36.

10 27. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende los residuos 1-417 de SEC ID N°: 37.

28. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27.

15 29. Una célula huésped no humana que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27.

30. Un animal transgénico no humano que expresa el polipéptido de la reivindicación 24.

31. El animal transgénico de la reivindicación 32, en el que el polipéptido se expresa en la leche de dicho animal.

20 32. Un procedimiento de producción de un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 29, que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 25, en condiciones de forma que el anticuerpo o fragmento se produzca, y aislar dicho anticuerpo de la célula huésped o cultivo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

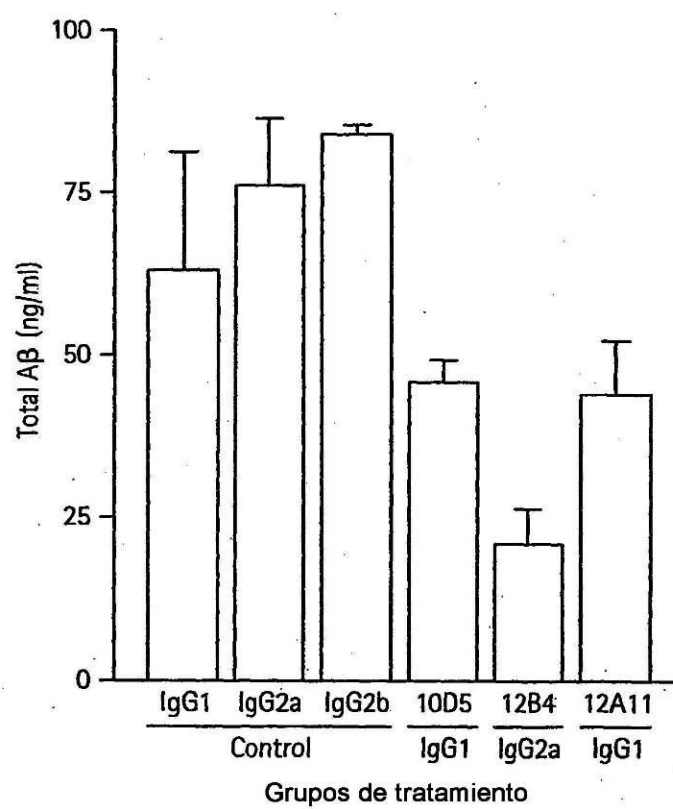


FIG. 2A

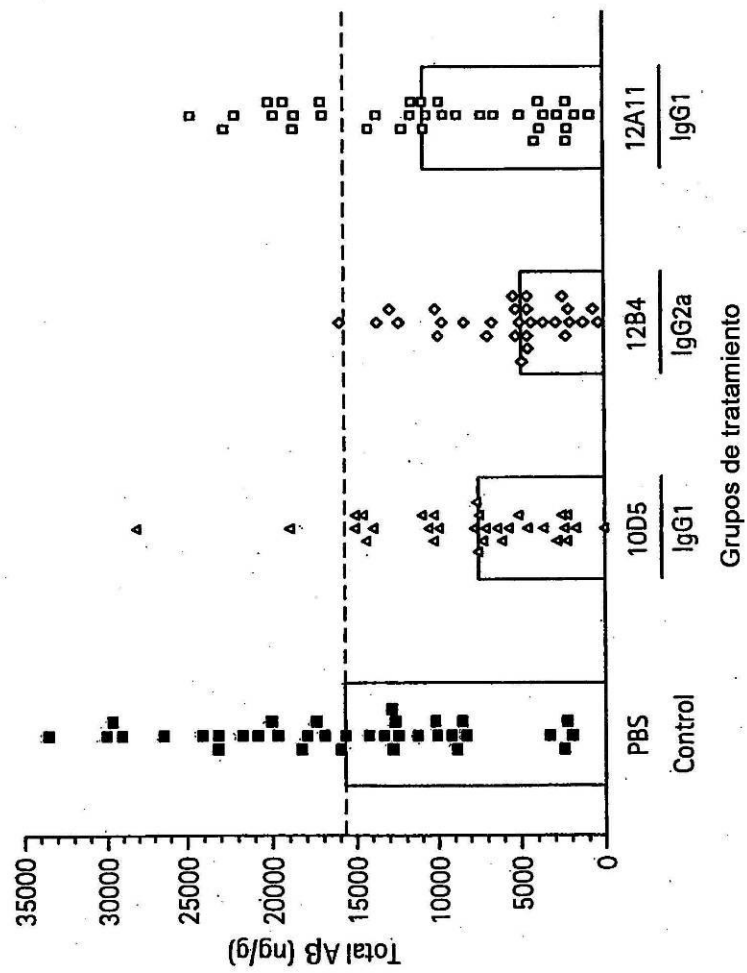


FIG. 2B

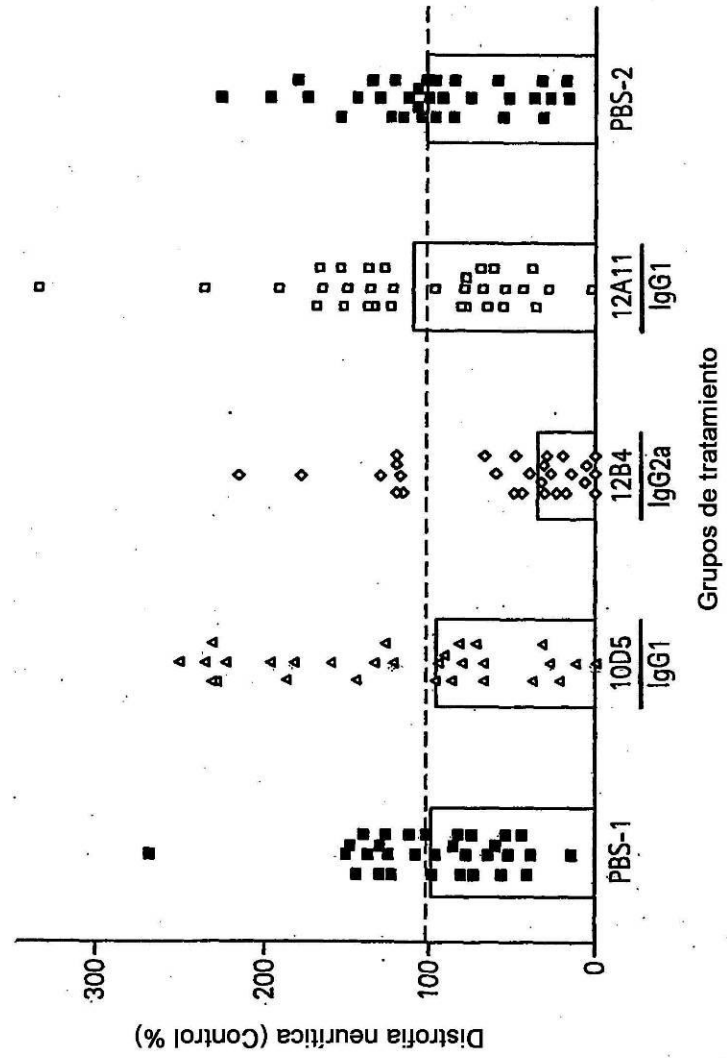


Figura 3

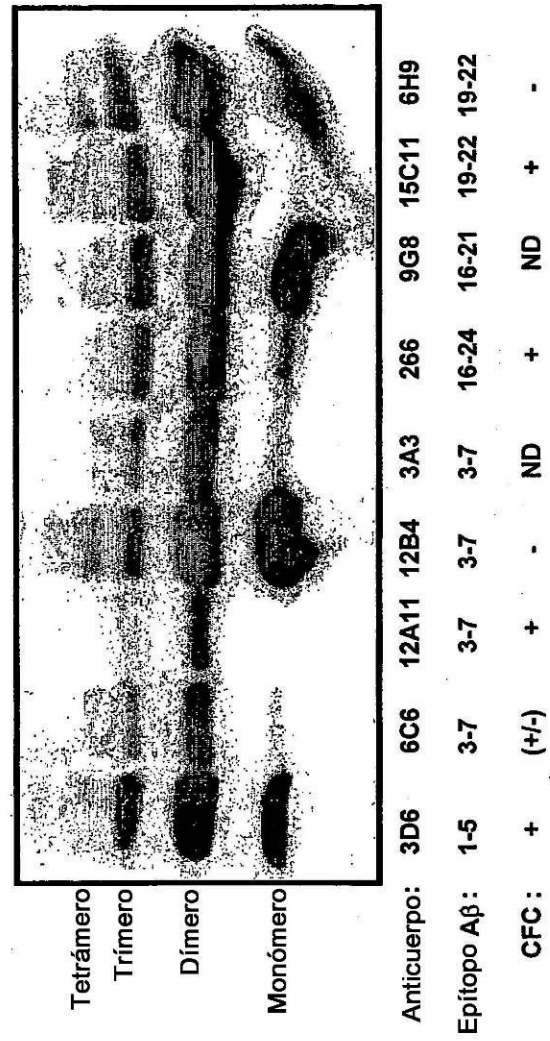
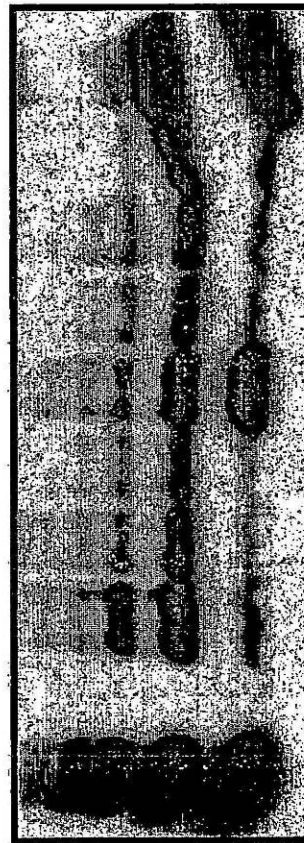


Figura 4



Tetrámero
Trímero
Dímero
Monómero

Anticuerpo: 3D6 6C6 12A11 12B4 10D5 3A3 266 6H9
Epítipo Aβ: 1-5 3-7 3-7 3-7 3-6 3-7 16-24 19-22
CFC: + (+/-) + - + ND + -

Figura 5A

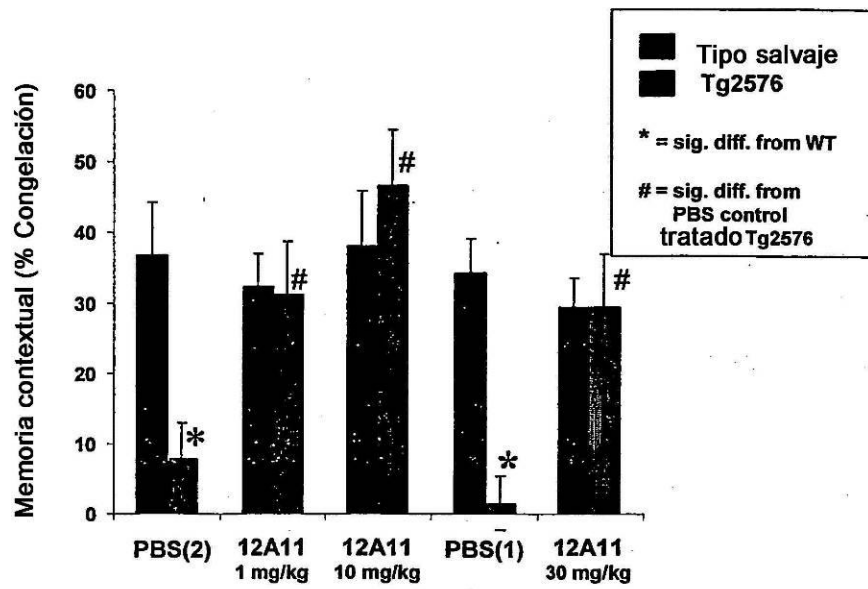


Figura 5B

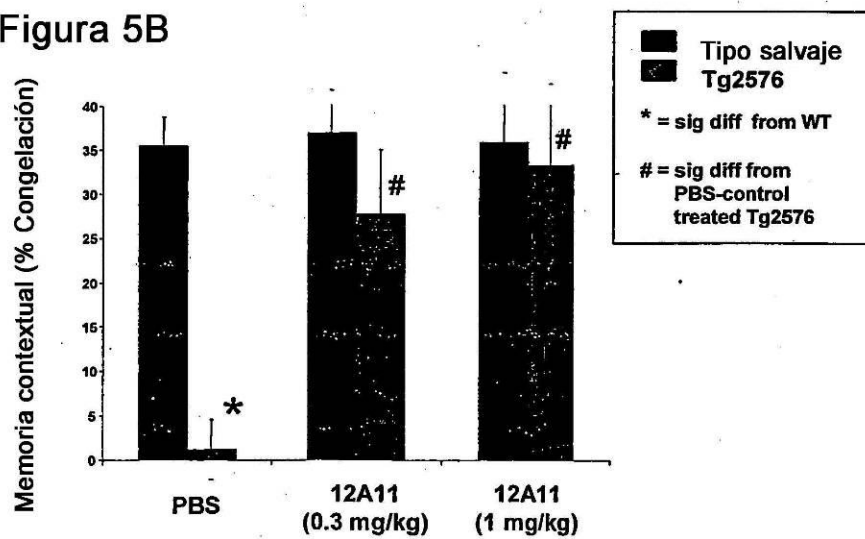


FIG.6

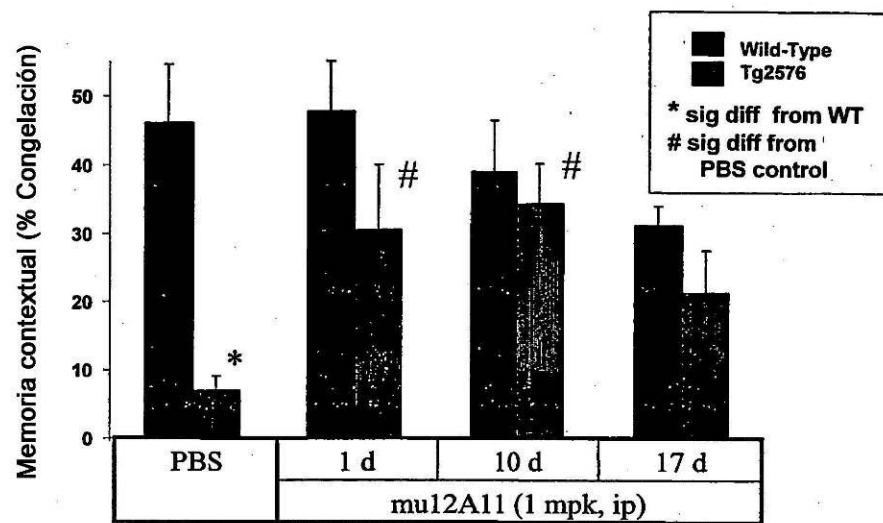
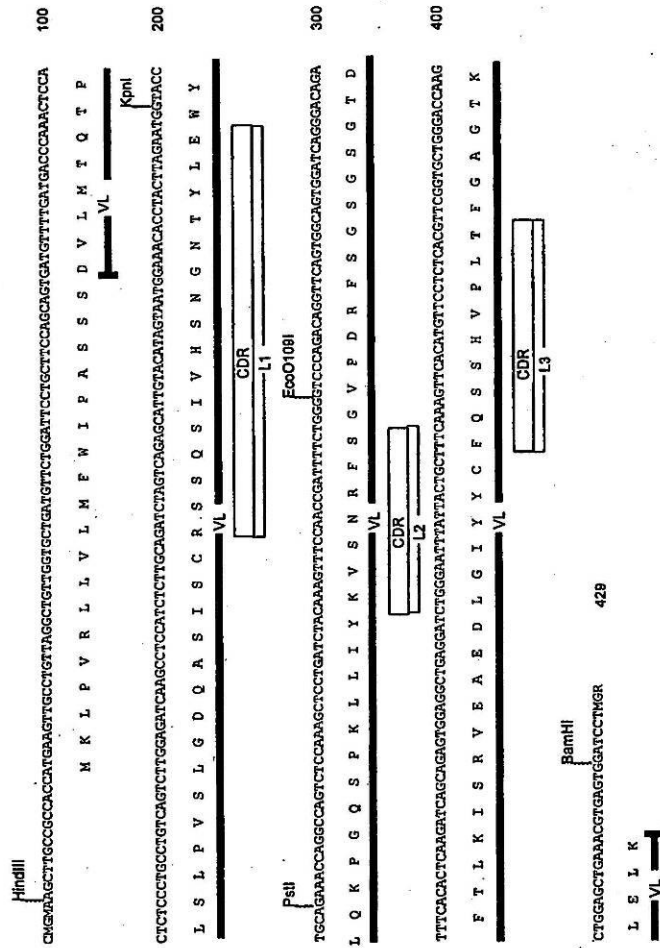


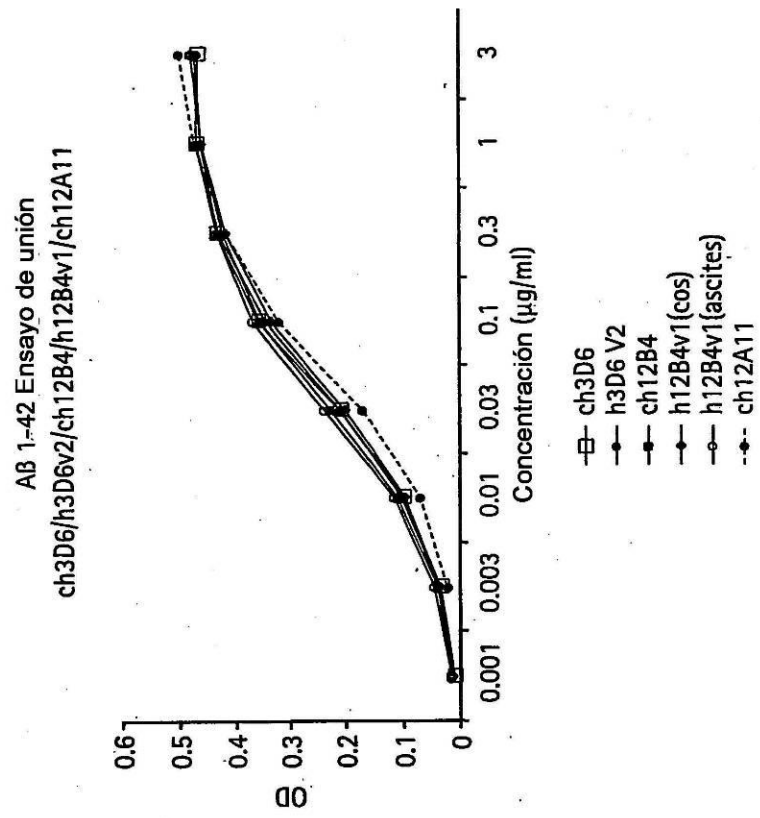
FIG.7A



9

100
HindIII
AAGCTTCCGCCACCATGGACGGCTTACTCTTCATCTGCTGCTGATTGTCCCTGCGATATGCTTGTCCCAAGTACTCTATAAGAGTCTGSCCCTG
M D R L T T S F L L I V P A Y V L S Q V T L K E S G P
KpnI
GGATTATGAGCGCTCACAGACCCCTCAGTCTGACTGTCTTCTCTGGGTTTCACTGAGCAGCTCTGGTATGATGTGTAGCTGGATTGTCAGCCTTC
G I L K P S Q T L S L T C S F S L S T S G M S V G W I R Q P S
EcoRI
AGGAGGGTGTGGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGATAGTACTATACCCATCCCTGGAGGCGGCTCACATCTCCAGGTACTCTCC
G K G L E W L A H I W D D D K Y Y N P S L K S R L T I S K D T S
CDR H2
AGAACCGGATTCCTCAGTATCACCAGTGTGGACACTGCGAGTACTGGCCTTACTTACTGTCTCGCAGACTCTACGGCTGACTTTGCTTACT
R N Q V F L K I T S V D T A D T A T Y C A R R T T T A D Y F A Y
BamHI
GGGGCCAGGACCACTCTCTACAGTCTCCTCAGGTAGTGGATCC 445
W G Q G T T L T V S S
CDR H3

FIG. 8



h12A11 VL Design

[illegible]

Ch12A11VH#1	MDRLTTSTFLLLIIVPAYVLS	QVTLKESGPGIILKPSQTL	SLT	40
h12A11VH.prot	-----	QVQLVESGGGVVQPPGRSL	RLS	21
aaa69734VH	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	QVQLVESGGGVVQPPGRSL	RLS	40
567123 Vhgermline	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	QVQLVESGGGVVQPPGRSL	RLS	40

Ch12A11VH#1	CSEFSSGFSHSS	TSGMSVGVWIRQQ	PSGKGLLEWLLA	HIWWD	D	-	DKY	79
h12A11VH.prot	CASFSSGFSHSS	TSGMSVGVWIRQQ	PSGKGLLEWLLA	HIWWD	D	-	DKY	60
aaa69734VH	CASFSSGFSHSS	TSGMSVGVWIRQQ	PSGKGLLEWLLA	HIWWD	D	-	DKY	78
567123 Vhgermline	CASFSSGFSHSS	TSGMSVGVWIRQQ	PSGKGLLEWLLA	HIWWD	D	-	DKY	78

Ch12A11VH#1	YNPSSLKSRRLT	TISKDDTSRN	QVLEFKITTSVDTA	DTAT	Y	Y	CA	RR	-	118
h12A11VH.prot	YNPSSLKSRRLT	TISKDDTSRN	QVLEFKITTSVDTA	DTAT	Y	Y	CA	RR	-	99
aaa69734VH	YADSVKGRFR	TISRDM	SKNTLLY	Y	Y	Y	CA	RR	D	118
567123 Vhgermline	YADSVKGRFR	TISRDM	SKNTLLY	Y	Y	Y	CA	RR	D	118

Ch12A11VH#1	RTTTADYFAY	-----	WQGGT	T	T	L	T	V	S	S	139
h12A11VH.prot	RTTTADYFAY	-----	WQGGT	T	T	L	T	V	S	S	120
aaa69734VH	RHSSSWYYGMDV	Y	WQGGT	T	L	T	V	S	S	S	141
567123 Vhgermline	AKLLMLLIS	GA	K	Q	W	S	P	S	L		137

FIG.10A

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v1
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v2
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v2.1
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v3
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v3.1
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v4.1
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v4.2
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v4.3
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v4.4
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v5.1
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v5.2
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v5.3
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v5.4
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v5.5
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v5.6
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v6.1
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v6.2
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v6.3
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ VA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v6.4
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v7
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ₁ ESGFTLS ₂	TSGMSVG	W ₁ LRQAPGKGLEW ₂ IA ₃	HIWDDDKYYNPSLKS	v8

FIG.10B

RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v1
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v2
RFTISKDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v2.1
RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v3
RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v3.1
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v4.1
RFTISKDLKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v4.2
RFTISKDLKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v4.3
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v4.4
RFTISKDLKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.1
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.2
RFTISKDLKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.3
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.4
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.5
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.6
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v6.1
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v6.2
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v6.3
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v6.4
RFTISKDESKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v7
RFTISKDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v8

FIG.10C

```

>vh design A24F T28S F29L V37I V48L F67L R71K N73T L78V - version 1
>vh design A24F          F29L V37I          R71K N73T          - version 2
>vh design A24F          F29L V37I          R71K              - version 2.1
>vh design A24F          F29L V37I          - version 3
>vh design A24F          F29L V37I V48L          - version 3.1
>vh design A24F          F29L V37I V48L F67L R71K N73T L78V - version 4.1
>vh design A24F T28S F29L V37I          F67L R71K N73T L78V - version 4.2
>vh design A24F T28S F29L V37I V48L          R71K N73T L78V - version 4.3
>vh design A24F T28S F29L V37I V48L F67L R71K N73T          - version 4.4
>vh design A24F          F29L V37I          F67L R71K N73T L78V - version 5.1
>vh design A24F          F29L V37I V48L          R71K N73T L78V - version 5.2
>vh design A24F          F29L V37I V48L F67L R71K N73T          - version 5.3
>vh design A24F T28S F29L V37I          R71K N73T L78V - version 5.4
>vh design A24F T28S F29L V37I          F67L R71K N73T          - version 5.5
>vh design A24F T28S F29L V37I V48L          R71K N73T          - version 5.6
>vh design A24F          F29L V37I          R71K N73T L78V - version 6.1
>vh design A24F          F29L V37I          F67L R71K N73T          - version 6.2
>vh design A24F          F29L V37I V48L          R71K N73T          - version 6.3
>vh design A24F T28S F29L V37I          R71K N73T          - version 6.4
>vh design A24F          F29L          V48L F67L R71K N73T L78V - version 7
>vh design A24F T28S F29L V37I V48L F67L R71K          L78V - version 8

```

FIG. 11

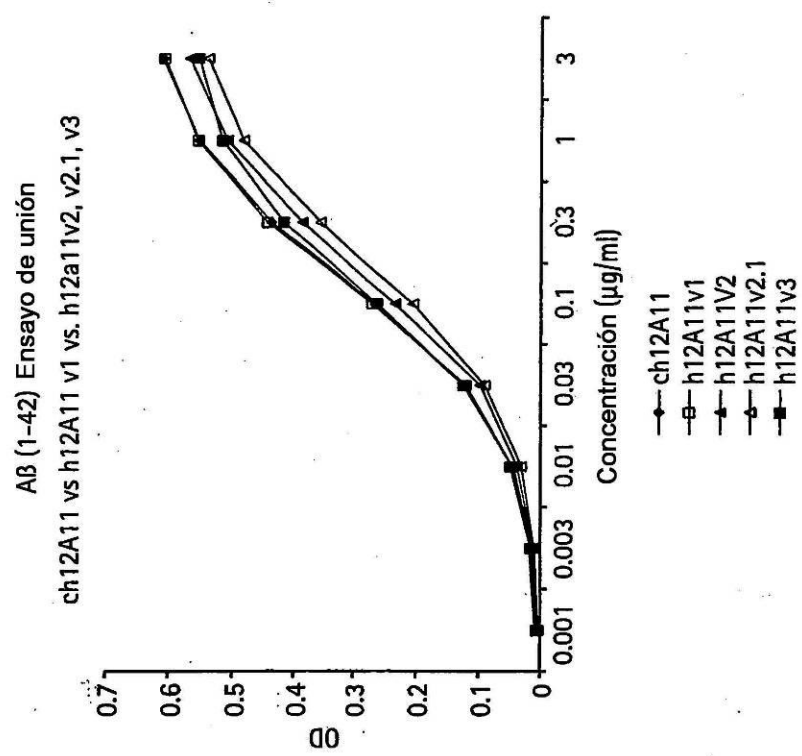


FIG. 12

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

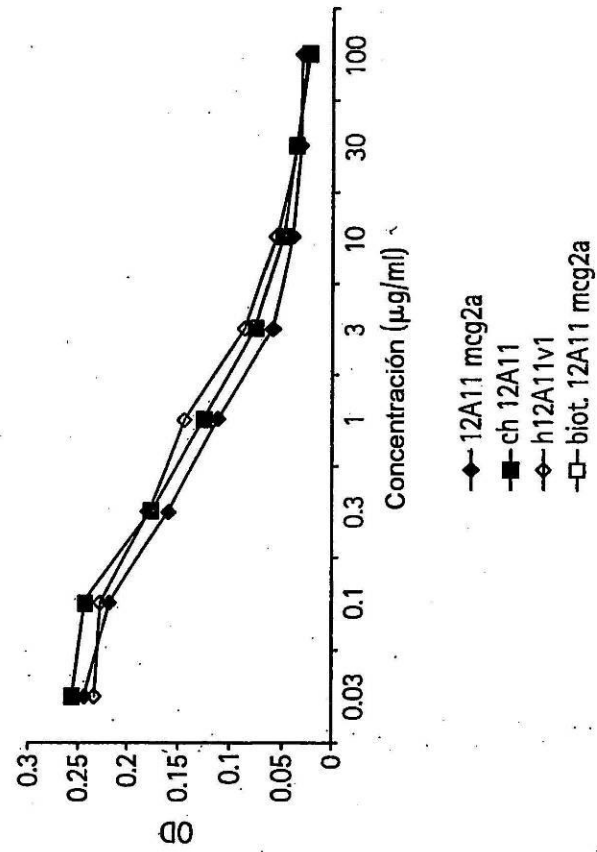


Figura 13

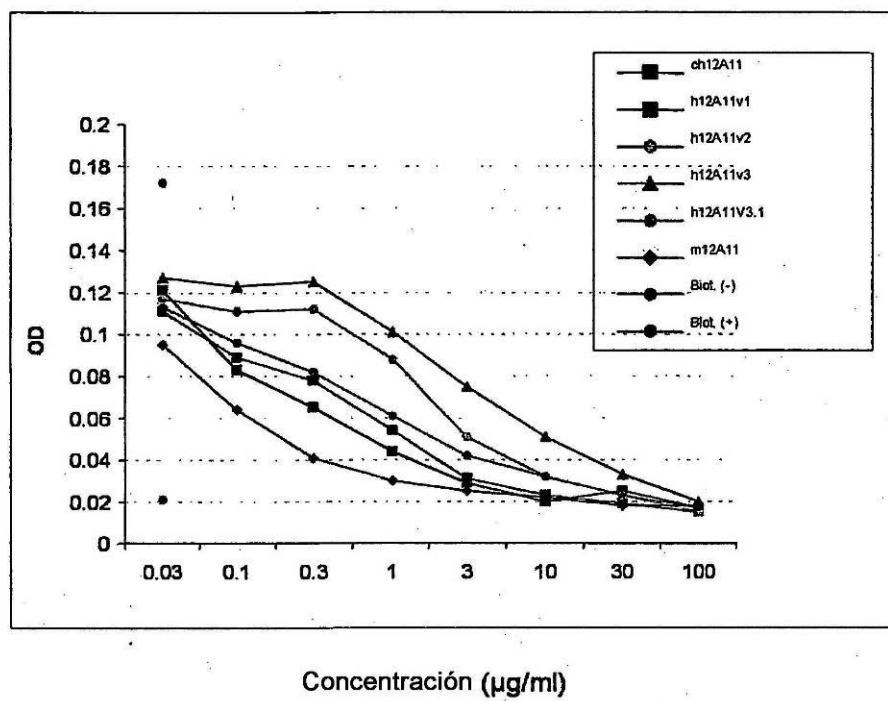


Figura 14

