

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 490**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2008 E 08700998 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2099826**

54 Título: **Anticuerpo anti-beta amiloide y usos del mismo**

30 Prioridad:

**05.01.2007 US 878831 P**

**05.01.2007 EP 07000211**

**11.06.2007 US 934291 P**

**17.10.2007 EP 07020341**

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

**23.01.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF ZURICH (100.0%)  
PROTEKTORAT FORSCHUNG RÄMISTRASSE 71  
8006 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:

**NITSCH, ROGER;  
HOCK, CHRISTOPH;  
ESSLINGER, CHRISTOPH;  
KNOBLOCH, MARLEN;  
TISSOT, KATHRIN y  
GRIMM, JAN**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 439 490 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**

Anticuerpo anti-beta amiloide y usos del mismo

**Campo de la invención**

5

[0001] La presente invención se refiere a nuevas moléculas de unión específicas, particularmente anticuerpos humanos así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos que reconocen epítomos asociados con enfermedades, incluyendo neoepítomos, de proteínas que derivan de proteínas nativas endógenas, y que son predominantes en el cuerpo de un paciente en una forma variante y/o fuera de su contexto fisiológico normal. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas de unión, anticuerpos y miméticos de los mismos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis y patología beta-amiloide.

10

**Antecedentes de la invención**

[0002] El éxito de la generación de anticuerpos monoclonales se basa en la fusión eficaz y selectiva de células B estimuladas por antígeno con una línea celular de mieloma murina seguido de la selección de híbridos que producen anticuerpos de forma estable como describieron originalmente Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495-497. Sin embargo, la utilidad terapéutica de los anticuerpos murinos en los seres humanos está dificultada por la respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) debido a su origen no humano. Las estrategias para preparar anticuerpos monoclonales humanos o semejantes a humanos han sido posibles mediante la ingeniería genética. Sin embargo, los métodos disponibles hasta ahora presentan el inconveniente de que no son adecuados para producir anticuerpos con las características de los producidos en el curso de una respuesta inmune fisiológica humana. Además, dichos anticuerpos pueden no ser lo suficientemente específicos debido a la reactividad cruzada con otras proteínas y/o la proteína diana en contexto con la función fisiológica normal. En el caso de la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, por ejemplo, se considera que los anticuerpos que también reaccionan de manera cruzada con alta afinidad con derivados fisiológicos de la proteína precursora del amiloide (APP) o alfa sinucleína presentan efectos secundarios relacionados con las funciones normales de las estructuras fisiológicas diana. A este respecto, una enfermedad autoinmune no deseada se induciría de forma completa - un riesgo difícilmente calculable en el diseño conceptual de experimentos de inmunización activa que emplean estructuras proteicas que, en forma variante, también ocurren fisiológicamente. Los efectos secundarios no relacionados con la estructura diana son, por ejemplo, reacciones anafilácticas, como se esperaría como efectos secundarios no deseados y temidos de la administración sistémica de proteínas exógenas. Según descubrimientos recientes, éste también puede ser el caso en los anticuerpos denominados humanizados, que surgen originariamente de organismos no humanos, habitualmente de ratones. Por otra parte, la inmunización activa con antígenos patológicos relevantes presenta el riesgo considerable de que los pacientes desarrollen anticuerpos y respuestas de células T que también reconocen variantes fisiológicas de dichas proteínas y, consecuentemente, dan lugar a una respuesta autoinmune peligrosa e incontrolable.

20

25

30

35

40

[0003] De este modo, existe una necesidad de proporcionar agentes que sean específicos para una diana implicada en un trastorno y que se toleren por el cuerpo humano.

**Características de la invención**

[0004] El problema técnico que subyace a la presente invención se ha resuelto por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

45

[0005] La presente invención hace uso del descubrimiento sorprendente de que los anticuerpos también pueden estar dirigidos frente a variantes patofisiológicamente relevantes de proteínas endógenas, en particular frente a neoepítomos, que se forman debido a la alteración patológica de la de transcripción, traducción o modificación posterior a la transcripción o posterior a la traducción o procesamiento proteolítico o agregación. Dichos anticuerpos están dirigidos frente a proteínas endógenas que, debido a su nueva estructura que se desvía de la fisiología normal, se vuelven patofisiológicamente relevantes mediante el desarrollo de efectos patológicos. Por razones de tolerancia inmune, los anticuerpos conectados con la respuesta inmune correspondiente a neoepítomos en dichas variantes patológicas no presentan normalmente, sin embargo, ninguna reacción cruzada frente a las proteínas fisiológicamente funcionales, a diferencia del caso de las enfermedades autoinmunes. Esto se debe a que la formación de anticuerpos con reactividad cruzada potencial se suprime específicamente por los mecanismos conocidos de tolerancia, mientras que el desarrollo de una respuesta inmune a neoepítomos patológicos puede escapar de la tolerancia.

50

55

[0006] La presente invención está dirigida a anticuerpos humanos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en el que la VH comprende una primera región determinante de la complementariedad (VHCDR1) con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, una VHCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y una VHCDR3 con la secuencia de

60

aminoácidos SEQ ID NO: 22, y en el que la VL comprende una VLCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23, una VLCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24 y una VLCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, xenogénico o quimérico humano-murino, siendo el último particularmente útil para los métodos de diagnóstico y estudios en animales. También están incluidas las composiciones terapéuticas que incluyen el anticuerpo o fragmentos activos del mismo, o agonistas y moléculas cognadas, o alternativamente, antagonistas del mismo, y los métodos de uso de dichas composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad usando estas composiciones, en el que una cantidad eficaz de la composición se administra a un paciente que necesita dicho tratamiento.

5  
10 **[0007]** El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento de cadena única Fv, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab)<sub>2</sub> o cualquier otro fragmento de unión a antígeno. En una realización específica, *infra*, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humano de isotipo IgG.

15 **[0008]** La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Dicha región variable comprende al menos la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de la presente invención.

20 **[0009]** Por consiguiente, la presente invención también engloba vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped transformadas con éstos así como su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes que son específicas para neopítopos que son indicativos y/o causales de la enfermedad de Alzheimer.

25 **[0010]** El anticuerpo, la cadena o cadenas de inmunoglobulina, fragmentos de unión del mismo y la unión a antígeno a dicho anticuerpo pueden usarse en composiciones farmacéuticas y de diagnóstico para inmunoterapia y diagnóstico, respectivamente. Sin embargo, se prefiere el uso de las composiciones anteriores en la preparación de un medicamento.

30 **[0011]** Por lo tanto, es un objeto particular de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento o prevención o retraso del inicio de enfermedades asociadas con la acumulación y depósito del péptido beta amiloide en un sujeto, tal como enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, disfunción cognitiva leve, angiopatía amiloide cerebral, demencia vascular, demencia multi-infarto. El tratamiento comprende administrar una concentración eficaz de un anticuerpo o derivado de anticuerpo al sujeto en el que el anticuerpo se une a la forma patológica de la proteína o el depósito de proteínas con una afinidad mayor que a la forma fisiológica normal de la proteína. Las realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

### 35 Descripción breve de los dibujos

**[0012] Figura 1:** Anticuerpo frente a beta-amiloide. **A:** Anticuerpos humanos. **B:** Tinción control con anticuerpo conocido frente a beta-amiloide humano. Los pacientes excepcionalmente estables clínicamente con enfermedad de Alzheimer contienen anticuerpos frente a las placas beta-amiloides. La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos de pacientes excepcionalmente estables clínicamente en secciones cerebrales obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente revela anticuerpos que se unen a las placas beta-amiloides confirmado por un anticuerpo conocido frente a beta-amiloide humano.

45 **[0013] Figura 2:** Anticuerpo frente a ovillos neurofibrilares. **A:** Anticuerpos humanos. **B:** Tinción control con anticuerpo conocido frente a tau humano. Los sujetos humanos sanos contienen anticuerpos frente a los ovillos neurofibrilares. La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos de sujetos sanos en secciones cerebrales obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente revela anticuerpos que se unen a los ovillos neurofibrilares confirmado por un anticuerpo conocido frente a tau humano.

50 **[0014] Figura 3:** Anticuerpo frente a neuritas distróficas. **A:** Anticuerpos humanos. **B:** Tinción control con anticuerpo conocido frente a tau humano. Los sujetos humanos sanos contienen anticuerpos frente a las neuritas distróficas. La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos de sujetos sanos en secciones cerebrales obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente revela anticuerpos que se unen a neuritas distróficas.

55 **[0015] Figura 4:** Anticuerpo frente a beta-amiloide. La figura muestra la unión específica del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 que se aisló de un paciente excepcionalmente estable clínicamente con enfermedad de Alzheimer frente a placas beta-amiloides cerebrales. Las secciones cerebrales obtenidas de un paciente con enfermedad de Alzheimer confirmada neuropatológicamente se tiñeron con anticuerpo humano recombinante a las concentraciones indicadas. La unión del anticuerpo a las placas beta-amiloides con concentraciones de 50 pM sugiere una unión de alta afinidad.

60

**[0016] Figura 5:** La unión del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a placas beta-amiloides no se ve afectada por competición por polipéptidos Abeta sintéticos lineales N-terminales. La unión del anticuerpo recombinante frente a beta-amiloide cerebral (0,5 nM) no se ve afectada por competición por el polipéptido derivado de Abeta N-terminal que representa las posiciones 1 a 16 a concentraciones de hasta 1 µM.

5

**[0017] Figura 6:** El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 reconoce un epítipo conformacional Abeta que no está presente en Abeta monomérico. La unión de NI-101.11 a las placas beta-amiloides en secciones cerebrales puede verse afectada por competición por fibrillas Abeta1-42 pero no por monómeros Abeta1-42 sintéticos lineales.

**[0018] Figura 7:** El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 no se une a Abeta sintético lineal, monomérico en transferencias Western. Las preparaciones de Abeta monomérico se separaron por PAGE no desnaturizante. La proteína transferida se ensayó con anticuerpo humano recombinante frente a beta-amiloide y anticuerpos control frente a secuencias Abeta lineales N-terminales (6E10). No se detectó unión de NI-101.11 a Abeta monomérico. Esta observación sugiere que el anticuerpo reconoce un epítipo conformacional de Abeta.

10

**[0019] Figura 8:** El anticuerpo humano NI-101.11 se une a fibrillas amiloides artificiales preparadas a partir de péptidos Abeta1-42 sintéticos. Las fibrillas sintéticas Abeta o Abeta sintético monomérico que se utilizaron para recubrir placas ELISA a densidades de recubrimiento iguales se incubaron con anticuerpos humanos recombinantes frente a beta-amiloide cerebral a las concentraciones indicadas. La actividad de unión del anticuerpo humano frente a beta-amiloide cerebral a fibrillas amiloides artificiales (cuadrados abiertos) es más de 100 veces mayor comparado con Abeta monomérico (cuadrados llenos). El anticuerpo control 22C4 se une preferentemente a Abeta monomérico (círculos llenos) y peor a fibrillas (círculos abiertos). Esto sugiere que NI-101.11 reconoce un epítipo conformacional que también está presente en las fibrillas amiloides artificiales preparadas a partir de péptidos Abeta sintéticos.

15

**[0020] Figura 9:** Ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a APP celular de longitud completa o con cualquiera de sus derivados fisiológicos que aparecen en células cultivadas. A diferencia del anticuerpo control (6E10) que se une a APP de la superficie celular, está ausente la unión de NI-101.11 a APP de longitud completa presente en la superficie celular. Estos datos demuestran la ausencia de reactividad cruzada de NI-101.11 a APP celular, fisiológica de longitud completa.

25

**[0021] Figura 10A-C:** Ausencia de unión de NI-101.11 a Abeta monomérico mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las Figuras 10A y 10B muestran ausencia de unión de NI-101.11 o un anticuerpo control no relacionado a Abeta1-42 monomérico marcado con FITC mientras que la Figura 10C muestra una unión prominente del anticuerpo 22C4 que reconoce un epítipo lineal presente en el C-terminal de Abeta.

30

**[0022] Figura 11:** ELISA de competición que muestra que la unión del anticuerpo 6E10, un anticuerpo dirigido frente a un epítipo lineal en el N-terminal de Abeta, podía bloquearse completamente después de pre-incubación con concentraciones en exceso de péptidos Abeta monoméricos mientras que la pre-incubación con concentraciones en exceso de estas preparaciones de péptido Abeta monomérico no suprimió la unión de NI-101.11.

35

**[0023] Figura 15:** El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 frente a beta-amiloide cerebral cruza la barrera hemato encefálica en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer y se une a las placas beta-amiloides cerebrales *in vivo*.

**[0024] Figura 16A-B:** El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 mejora el comportamiento cognitivo anormal en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer. Se trataron ratones arcAbeta de 24 meses de edad semanalmente i.p. con 3 mg/kg de anticuerpo durante 2 meses. Se realizó un ensayo de comportamiento en laberinto en Y antes y después de la finalización del tratamiento.

**[0025] Figura 17:** Penetración de la barrera hemato encefálica y decoration de placas amiloides por NI-101.11 administrado periféricamente. NI-101.11 puede cruzar la barrera hemato-encefálica y unirse a depósitos beta-amiloides en ratones tratados con NI-101.11 (panel izquierdo) mientras que no es visible dicha tinción en animales tratados con el anticuerpo humano control (panel derecho). El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 reduce la carga de placa beta-amiloide cerebral después del tratamiento sistémico durante dos meses.

45

**[0026] Figura 18:** La inmunización pasiva con NI-101.11 reduce la carga beta-amiloide en ratones arcAbeta. (A, B) Los análisis de la carga de placa con Tioflavina S y Rojo Congo revelan reducciones significativas de más del 50% comparado con los animales tratados con el anticuerpo control (Mann-Whitney U; p= 0,02 para corteza, p= 0,009 para hipocampo para TioS y p= 0,009 para corteza y p= 0,04 para hipocampo para análisis con Rojo Congo). Barra de escala: 200 µm. (C-E). El análisis con Tioflavina S revela una reducción significativa en la carga de beta-amiloide (C), número de placas beta-amiloides (D) y tamaño medio de las placas (E) en ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 comparado con

50

55

60

los animales tratados control. Estadística Mann-Whitney U:  $p=0,02$  para área de placa en corteza;  $p=0,009$  para área de placa en hipocampo;  $p=0,047$  para número de placas en la corteza;  $p=0,047$  para número de placas en el hipocampo;  $p=0,009$  para tamaño de placas en la corteza;  $p=0,009$  para número de placas en el hipocampo.

5 **[0027] Figura 19:** La carga beta-amiloide reducida está acompañada de astrocitosis y microgliosis reducidas A) La cuantificación de tinción anti-GFAP reveló una reducción significativa en el número de astrocitos reactivos en la corteza de ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 cuando se compara con transgénicos tratados con control. B) La cuantificación de tinción Iba-1 mostró una tendencia hacia un número reducido de microglia activados en ratones tratados con NI-101.11 en la corteza e hipocampo. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

10 **[0028] Figura 20:** Ausencia de incremento de microhemorragias cerebrales después de dos meses de tratamiento con anticuerpo humano recombinante NI-101.11. Se trataron ratones arcAbeta de 24 meses de edad con angiopatía amiloide congofílica masiva probada semanalmente i.p. con 3 mg/kg de anticuerpo durante 2 meses. Foto representativa de una microhemorragia cerebral en ratones arcAbeta revelada por tinción de azul de Prusia de Perl (izquierda). El análisis cuantitativo demuestra una frecuencia significativamente elevada de microhemorragias en ratones transgénicos arcAbeta comparado con los miembros de su camada de tipo salvaje. El tratamiento crónico con NI-101.11 no resultó en una frecuencia incrementada de microhemorragias. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

15 **[0029] Figura 21:** El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 inhibe la formación de fibrillas sintéticas de Abeta *in vitro*. El efecto del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 en la formación de fibrillas de Abeta se ensayó midiendo Tioflavina S unida a Abeta agregado por análisis de fluorescencia.

20 **[0030] Figura 22:** Se midió la fagocitosis dependiente de la dosis, mediada por anticuerpo de fibrillas Abeta1-42-FITC por células microgliales BV-2 después de inhibición del sistema de receptor de secuestro ("scavenger"). NI-101.11 desencadena una fagocitosis potente mediada por el receptor Fcgamma dependiente de la dosis de fibrillas Abeta.

## Descripción detallada de la invención

### 1. Definiciones

30 **[0031]** Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en la presente memoria. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión a antígeno que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de inmunoglobulinas en los sistemas de vertebrados se entienden relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed. 1988).

35 **[0032]** Como se discutirá con más detalle más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende varias clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Los expertos en la materia entenderán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG, o IgE, respectivamente. Las subclases (isotipos) de inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por el experto en la materia a la vista de la presente descripción y, de acuerdo con esto, están en el alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente en el alcance de la presente invención, la discusión siguiente estará dirigida generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos con un peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con un peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas típicamente por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras reúnen a las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

40 **[0033]** Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí y las partes de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por uniones disulfuro covalentes o uniones no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan bien por hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente por ingeniería. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un extremo N en los extremos en horquilla de la configuración Y hasta el extremo C en el final de cada cadena.

45 **[0034]** Tanto las cadenas ligeras como pesadas están divididas en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se entenderá que los dominios variables tanto de las partes de cadena ligera (VL) como pesada (VH) determinan el reconocimiento y especificidad de antígeno. A la

inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión a receptor Fc, unión a complemento y semejantes. Por convención, la numeración de los dominios de región constante se incrementa al alejarse del sitio de unión a antígeno o extremo amino del anticuerpo. La parte N terminal es una región variable y en la parte C terminal está una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden realmente el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

**[0035]** Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítopos en antígenos. Esto es, el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria de anticuerpo forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL. Cualquier fragmento de anticuerpo o inmunoglobulina que contiene estructura suficiente para unirse específicamente a un antígeno se indica en la presente memoria indistintamente como un "fragmento de unión a antígeno" o un "fragmento inmuno-específico".

**[0036]** En los anticuerpos naturales, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que están situadas específicamente para formar el dominio de unión a antígeno al asumir el anticuerpo su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Los aminoácidos restantes en los dominios de unión a antígeno, referidos como regiones "marco", muestran menos variabilidad inter-molecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de lámina  $\beta$  y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina  $\beta$ . Así, las regiones marco actúan para formar un andamio que proporciona el posicionamiento de las CDR en una orientación correcta por interacciones inter-cadena, no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunoreactivo. Esta superficie complementaria estimula la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo correspondiente. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, pueden ser identificados fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por un experto en la materia, ya que han sido definidos de manera precisa (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)).

**[0037]** En el caso en el que existen dos o más definiciones de un término que se usa y/o acepta en la técnica, la definición del término tal y como se usa en la presente memoria se pretende que incluya todos estos significados a no ser que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de la complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación a antígeno no contiguos encontrados en la región variable de los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987), en las que las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se compara una frente a la otra. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo se pretende que esté en el alcance del término como se define y usa en la presente memoria. Los residuos apropiados de aminoácidos que engloban las CDR como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente se muestran más adelante en la Tabla 1 como una comparación. Los números exactos de los residuos que engloban una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar rutinariamente qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

**Tabla 1:** Definiciones de CDR<sup>1</sup>

	<b>Kabat</b>	<b>Chothia</b>
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

<sup>1</sup>La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 es según las convenciones de numeración mostradas por Kabat *et al.* (véase más adelante).

**[0038]** Kabat *et al.*, también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar sin ambigüedad este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de cualquier dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Tal y como se usa en la presente memoria, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración mostrado por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A no ser que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos de aminoácidos en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención son según el sistema de numeración de Kabat.

**[0039]** Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos inmunespecíficos, variantes o derivados de los mismos de la invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos de cadena única, fragmentos de unión a epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, Fvs de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, Fvs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden bien un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos descritos en la presente memoria). Las moléculas scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

**[0040]** En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado de ésta con una estructura pentavalente. En particular, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente uso terapéutico, las IgM son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de unión correspondientes ya que las IgM debido a su estructura pentavalente y ausencia de maduración por afinidad muestran frecuentemente reactividades cruzadas inespecíficas y afinidad muy baja.

**[0041]** Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos de cadena única, pueden comprender la o las regiones variables solas o en combinación con todo o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También están incluidos en la invención fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos o fragmentos inmunespecíficos de los mismos de la presente invención pueden tener cualquier origen animal incluyendo pájaros y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o pollo. En otra realización, la región variable puede tener origen condrictoide (por ejemplo, de tiburones). Tal y como se usa en la presente memoria, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de pacientes humanos, bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe *infra* y, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.939.598 por Kucherlapati *et al.* Un anticuerpo humano todavía es "humano" incluso si se hacen sustituciones de aminoácidos en el anticuerpo, por ejemplo, para mejorar las características de unión.

**[0042]** Tal y como se usa en la presente memoria, el término "parte de cadena pesada" incluye las secuencias de aminoácidos derivadas de la cadena pesada de una inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una parte de cadena pesada comprende al menos uno de: dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de estos. Por ejemplo, un polipéptido de unión para uso en la invención puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH3 o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para uso en la invención puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Como se ha mostrado anteriormente, un experto en la materia entenderá que estos dominios (por ejemplo, las partes de cadena pesada) pueden modificarse de manera que varían en la secuencia de aminoácidos respecto a la molécula de inmunoglobulina natural.

**[0043]** En determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en la presente memoria, las partes de cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticas a aquellas en una segunda cadena polipeptídica del multímero. Alternativamente, los monómeros que contienen la parte de cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión a diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

**[0044]** Las partes de cadena pesada de un polipéptido de unión para usarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una parte de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG4.

**[0045]** Tal y como se usa en la presente memoria, el término "parte de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferiblemente, la parte de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

**[0046]** Se piensa que el tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo es aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epitopos de péptido o polipéptido contienen preferiblemente al menos siete, más preferiblemente al menos nueve y lo más preferiblemente entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Como una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, incluso pueden no estar en la misma cadena peptídica. En la presente invención, el epítipo de péptido o polipéptido reconocido por los anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferiblemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de A $\beta$ .

**[0047]** El término "neopítipo" según la presente invención indica un epítipo que es único para un patrón patológico y contenido en o formado por una proteína asociada con un trastorno que es una variante patológica de una proteína de otra manera no patológica y/o que se desvía de la fisiología del estado sano. Dichas variantes patofisiológicas pueden formarse mediante transcripción patológicamente alterada, traducción patológicamente alterada, modificación posterior a la traducción, procesamiento proteolítico patológicamente alterado, formación de complejo patológicamente alterado con parejas de interacción fisiológicas o patofisiológicas o estructuras celulares en el sentido de una co-localización alterada o conformación estructural patológicamente alterada - como por ejemplo agregación, oligomerización o fibrilación - cuya estructura tri o cuatridimensional se diferencia de la estructura de la molécula fisiológicamente activa. Además, una variante patofisiológica también puede caracterizarse porque no está localizada en su entorno fisiológico o compartimento subcelular habitual. Como un ejemplo, los neoepitopos pueden estar localizados en las estructuras patológicamente conspicuas en las áreas de tejidos cerebrales que experimentan obviamente o han experimentado ya daño funcional. Si una estructura dada, por ejemplo célula o tejido, o proteína presenta un neoepítipo puede verificarse revirtiendo el método descrito más adelante para aislar y caracterizar una molécula de unión específica de una proteína asociada con un trastorno en el que una molécula de unión, por ejemplo anticuerpo identificado por dicho método se usa para cribar una muestra para unión al anticuerpo, determinando de esta manera la presencia de un neoepítipo.

**[0048]** Las expresiones "específico de proteína asociada con enfermedad" y "específico de neoepítipo" se usan indistintamente en la presente memoria con el término "que reconoce específicamente un neoepítipo". Tal y como se usan en la presente memoria, los términos tales como "ausencia de reactividad cruzada", "específico", "que reconoce específicamente", "que se une específicamente", "que se une preferentemente" y semejantes se refieren a la capacidad de la molécula de unión para discriminar entre el neoepítipo de una proteína asociada con un trastorno y la proteína nativa en su forma de tipo salvaje y contexto natural. Así, la molécula de unión de la presente invención tiene una afinidad de unión preferente al neoepítipo sobre el antígeno de la proteína nativa por un factor de al menos dos, preferiblemente al menos 5, habitualmente más de por un factor de 10, particularmente preferido por un factor de 50 e incluso más preferido mayor de 100. Además, la  $K_D$  relativa de la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo para el epítipo diana específico, por ejemplo neoepítipo, es preferiblemente al menos 10 veces menor, más preferiblemente al menos 100 veces menor o más que la  $K_D$  para la unión de ese anticuerpo a otros ligandos o al equivalente nativo de la proteína asociada con la enfermedad.

**[0049]** Por "se une específicamente" o "reconoce específicamente", usados indistintamente en la presente memoria, se quiere decir generalmente que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno y que la unión conlleva alguna complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo al azar, no relacionado. El término "especificidad" se usa en la presente memoria para calificar la afinidad relativa por la que un determinado anticuerpo se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, el anticuerpo "A" puede considerarse que tiene una mayor especificidad para un epítipo dado que el anticuerpo "B" o puede decirse que el anticuerpo "A" se une al epítipo "C" con una mayor especificidad de la que tiene para un epítipo relacionado "D".

**[0050]** Por “se une preferentemente” se quiere decir que la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo. Así, un anticuerpo que “se une preferentemente” a un epítipo dado se unirá más probablemente a ese epítipo que a un epítipo relacionado, a pesar de que dicho anticuerpo puede reaccionar de manera cruzada con el epítipo relacionado.

**[0051]** Como ejemplo no limitativo, puede considerarse que una molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une a dicho primer epítipo con una constante de disociación ( $K_D$ ) que es menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo epítipo.

**[0052]** En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) que es menor que la  $k(\text{off})$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la  $k(\text{off})$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitativo, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la  $k(\text{off})$  del anticuerpo para el segundo epítipo.

**[0053]** Puede decirse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en la presente memoria se une a un polipéptido diana descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) de menos de o igual a  $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ó  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Más preferiblemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a un polipéptido diana descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de disociación ( $k(\text{off})$ ) menor de o igual a  $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ó  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  ó  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ .

**[0054]** Puede decirse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en la presente memoria se une a un polipéptido diana descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de asociación ( $k(\text{on})$ ) mayor de o igual a  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ó  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Más preferiblemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a un polipéptido diana descrito en la presente memoria o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de asociación ( $k(\text{on})$ ) mayor de o igual a  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ó  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ó  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

**[0055]** Se dice que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo hasta el punto en el que bloquea, en algún grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos de ELISA de competición. Puede decirse que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado al menos un 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60% o al menos 50%.

**[0056]** Tal y como se usa en la presente memoria, el término “afinidad” se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de unión, por ejemplo una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988) en las páginas 27-28. Tal y como se usa en la presente memoria, el término “avidez” se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, esto es, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopos específicos como también con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo altamente repetitiva, tal como un polímero, sería una de alta avidez.

**[0057]** Las moléculas de unión, por ejemplo anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Tal y como se usa en la presente memoria, el término “reactividad cruzada” se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida de relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Así, un anticuerpo reacciona de manera cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo que reacciona de manera cruzada contiene generalmente muchas de las mismas características estructurales complementarias que el epítipo inductor, y en algunos casos, realmente puede ajustarse mejor que el original.

5 [0058] Por ejemplo, determinados anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, respecto a que se unen a epítomos relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítomos con al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% y al menos 50% de identidad (según se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con un epítomo de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítomos con menos de 95%, menos de 90%, menos de 85%, menos de 80%, menos de 75%, menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, menos de 55% y menos de 50% de identidad (según se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con un epítomo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse "altamente específico" para un determinado epítomo, si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítomo.

10 [0059] Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o  $K_D$  de menos de  $5 \times 10^{-2} M$ ,  $10^{-2} M$ ,  $5 \times 10^{-3} M$ ,  $10^{-3} M$ ,  $5 \times 10^{-4} M$ ,  $10^{-4} M$ ,  $5 \times 10^{-5} M$ ,  $10^{-5} M$ ,  $5 \times 10^{-6} M$ ,  $10^{-6} M$ ,  $5 \times 10^{-7} M$ ,  $10^{-7} M$ ,  $5 \times 10^{-8} M$ ,  $10^{-8} M$ ,  $5 \times 10^{-9} M$ ,  $10^{-9} M$ ,  $5 \times 10^{-10} M$ ,  $10^{-10} M$ ,  $5 \times 10^{-11} M$ ,  $10^{-11} M$ ,  $5 \times 10^{-12} M$ ,  $10^{-12} M$ ,  $5 \times 10^{-13} M$ ,  $10^{-13} M$ ,  $5 \times 10^{-14} M$ ,  $10^{-14} M$ ,  $5 \times 10^{-15} M$  ó  $10^{-15} M$ .

15 [0060] Como se ha indicado previamente, las estructuras de subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "dominio VH" incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término "dominio CH1" incluye el primer (más amino terminal) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y es amino terminal respecto a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

20 [0061] Tal y como se usa en la presente memoria, el término "dominio CH2" incluye la parte de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 hasta el residuo 360 de un anticuerpo usando los esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración EU; véase Kabat EA *et al. op. cit.* El dominio CH2 es único porque no está emparejado de cerca con otro dominio. En lugar de esto, dos cadenas de carbohidrato ramificadas unidas por N están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 al C terminal de la molécula IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

25 [0062] Tal y como se usa en la presente memoria, el término "región bisagra" incluye la parte de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 con el dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo de esta manera que las dos regiones de unión a antígeno N terminales se muevan independientemente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux *et al., J. Immunol.* 161: 4083 (1998)).

30 [0063] Tal y como se usa en la presente memoria, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayor parte de las moléculas IgG naturales, las regiones CH1 y CL están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración Kabat (posición 226 ó 229, sistema de numeración EU).

35 [0064] Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo preparado por ingeniería" se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en cualquiera de la cadena pesada y ligera o ambas está alterado por al menos el reemplazo parcial de una o más CDR de un anticuerpo con especificidad conocida y, si es necesario, por reemplazo parcial de la región marco y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones marco, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de una clase diferente y preferiblemente de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo preparado por ingeniería en el que se injertan una o más CDR "donantes" de un anticuerpo no humano con especificidad conocida en una región marco de cadena pesada o ligera humana se refiere en la presente memoria como un "anticuerpo humanizado". Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable del donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. En lugar de esto, puede ser necesario sólo transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión diana. Dadas las explicaciones mostradas, por ejemplo, en las Pat. U. S. Nos. 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370, estará dentro de la competencia de los expertos en la materia, bien llevando a cabo experimentación rutinaria o por ensayo de prueba y error, obtener un anticuerpo preparado por ingeniería o humanizado funcional.

5 [0065] Tal y como se usan en la presente memoria, los términos “unido”, “fusionado” o “fusión” se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión entre sí de dos o más elementos o componentes, por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una “fusión en marco” se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) de polinucleótidos para formar un ORF continuo, más largo, de una manera que mantiene el marco de lectura de traducción correcto de los ORF originales. Así, una proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (segmentos que normalmente no están así unidos en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace así continuo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar físicamente o espacialmente separados, por ejemplo, por secuencia conectora en marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de la región variable de una inmunoglobulina pueden estar fusionados, en marco, pero estar separados por un polinucleótido que codifica al menos una región marco de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDR “fusionadas” se co-traduzcan como parte de un polipéptido continuo.

15 [0066] Tal y como se usan en la presente memoria, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o diseminación del cáncer. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia comparado con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya presentan la afección o trastorno así como aquellos con tendencia a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se quiere prevenir la manifestación de la afección o trastorno.

25 [0067] Por “sujeto” o “individuo” o “animal” o “paciente” o “mamífero” se quiere decir cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para el que se desea diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

30 [0068] La presente invención se refiere a una molécula de unión como se caracteriza en las reivindicaciones, que es capaz de reconocer selectivamente un epítipo de una proteína asociada a enfermedad incluyendo un neoepítipo de una proteína asociada a enfermedad, que puede obtenerse o validarse preferiblemente por el método de la presente invención descrito anteriormente en la presente memoria e ilustrado en los ejemplos. Ventajosamente, la molécula de unión de la presente invención no reconoce sustancialmente dicha proteína en su forma no asociada a enfermedad; véase también *supra*.

35 [0069] Los medios y métodos para la producción recombinante de moléculas de unión, en particular anticuerpos y miméticos de los mismos así como los métodos para cribar moléculas de unión competitivas, que pueden o no ser anticuerpos, se conocen en la técnica y se resumen, por ejemplo, en la solicitud internacional WO2006/103116 respecto a anticuerpos frente a beta-amiloide y el tratamiento/diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

40 [0070] Sin embargo, como se describe en la presente memoria, en particular respecto a las aplicaciones terapéuticas en los seres humanos el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano. En este contexto, la proteína patológica variante reconocida por el anticuerpo está asociada con un trastorno neurológico, es decir, un trastorno del cerebro.

45 [0071] Además, como se demuestra en los Ejemplos 3 a 5, la molécula de unión de la presente invención, en particular un anticuerpo tiene varias propiedades biológicas ventajosas, una o más de las cuales se han conseguido por la presente invención por primera vez, por ejemplo, es capaz de:

- 50 (i) cruzar la barrera hemato encefálica, por ejemplo, en el sitio del evento patológico;
- (ii) unirse a placas beta-amiloides, amiloide cerebrovascular, depósitos Abeta difusos, ovillos neurofibrilares, tau hiperfosforilado, cuerpos de Lewy positivos para alfa-sinucleína o agregados proteicos asociados con neuritis distróficas;
- (iii) eliminar placas beta-amiloides en el cerebro y/o prevenir la formación de placas amiloides en el cerebro;
- 55 (iv) restaurar sustancialmente el comportamiento normal, y/o
- (v) no causar microhemorragias.

[0072] En una realización preferida particular, el anticuerpo o molécula de unión equivalente de la presente invención puede distinguirse de otros anticuerpos por una o más de las propiedades siguientes, por ejemplo, son capaces de:

- 60 1. pasar, al menos en cantidades pequeñas, la barrera hemato-encefálica en el sitio de los eventos patológicos;
2. unirse a una o más estructuras extracelulares o celulares patofisiológicamente relevantes;
3. dar lugar a la reducción de la estructura patofisiológicamente relevante *in vitro* o *in vivo*;

4. dar lugar a la reducción de la estructura patofisiológicamente relevante y a la reducción de una toxicidad asociada con ella;
5. dar lugar al bloqueo o retraso del proceso de la enfermedad;
6. dar lugar a la regeneración de funciones celulares y específicas de órgano y de organismo y posiblemente a una prevención secundaria de la recurrencia de la patofisiología original después de la degradación de la toxicidad conectada con la estructura patofisiológicamente relevante; y/o
7. no está asociada con microhemorragias incrementadas.

[0073] Además, la ausencia de reactividad cruzada con precursores o derivados fisiológicos da lugar a la consecuencia de que, en primer lugar, las concentraciones son predecibles ya que se evitan los efectos secundarios no deseados se pierden sustancialmente. Además, los reportes previos sugirieron una asociación de angiopatía amiloide cerebral (CAA) con reactividad vascular comprometida en un modelo de ratón transgénico con CAA (Mueggler et al., J Neurosci 22 (2002), 7218-24). La CAA grave que ocurre en ratones arcAβ viejos (Knobloch et al., Neurobiol. Aging 28: 1297-1306 (2007) epub 31 de julio, 2006) podría constreñir así la flexibilidad vasodilatadora de los vasos sanguíneos afectados. Según la presente invención, es prudente esperar que el tratamiento con los anticuerpos de la presente invención pueda mejorar la vasoreactividad y flujo sanguíneo cerebral en ratones transgénicos APP viejos. Esto puede validarse usando el modelo de ratones arcAβ descrito en Knobloch et al. (2006), *supra*, y descrito en la solicitud US "Transgenic animal model for Alzheimer's disease" por Grimm et al., número de serie 60/934.291 presentado el 11 de junio, 2007.

## II. Anticuerpos

[0074] La presente invención está dirigida además a las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión, variantes y derivados de los mismos, mostrados en la Tabla 2 y 3. La presente invención está dirigida más específicamente a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente al mismo neopéptido de una proteína asociada con un trastorno que un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-101.11.

[0075] La invención está dirigida además a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-101.11 al neopéptido de una proteína asociada con un trastorno.

[0076] La invención también está dirigida a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio de unión a antígeno idéntico al del anticuerpo NI-101.11.

[0077] La presente invención ejemplifica además varias de dichas moléculas de unión, por ejemplo anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, que pueden caracterizarse por comprender en su región variable, por ejemplo, dominio de unión, la una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable VH y VL que comprende las secuencias de aminoácidos representadas en la Tabla 2 (VH) y Tabla 3 (VL).

**Tabla 2.** Secuencias de aminoácidos de la región VH de anticuerpos específicos de beta-amiloide.

Anticuerpo	Secuencia variable de cadena pesada
NI-101.11	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFQFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVWFDGTTK YYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGT TVTSS (SEQ ID NO: 6)

**Tabla 3.** Secuencias de aminoácidos de la región VL de anticuerpos específicos de beta-amiloide.

Anticuerpo	Secuencia variable de cadena ligera (kappa o lambda)
NI-101.11	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 8)

[0078] Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican las regiones variables identificadas anteriormente se muestran en el listado de secuencias adjunto. El conjunto de CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región VH y VL según se representan en las Tablas 2 y 3 se proporciona en la Tabla 4. Sin embargo, como se discute en los que sigue, el experto en la materia es muy consciente del hecho de que pueden usarse CDR

además o alternativamente, que se diferencian en su secuencia de aminoácidos de las mostradas en la Tabla 4 por uno, dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

**Tabla 4.** Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de las regiones VH y VL de anticuerpos específicos de beta-amiloide.

Anticuerpo	Cadena pesada variable	Cadena ligera variable
<b>NI-101.11</b>		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)

[0079] En una realización, el anticuerpo de la presente invención es uno cualquiera de los anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la región VH y/o VL como se representa en las Tablas 2 y 3. Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que compite por la unión al neoepítipo con al menos uno de los anticuerpos que tienen la región VH y/o VL como se representa en las Tablas 2 y 3. Estos anticuerpos pueden ser también murinos, sin embargo, se prefieren los anticuerpos humanizados, xenogénicos o quiméricos humano-murino, en particular para aplicaciones terapéuticas. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fv de cadena única (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Para algunas aplicaciones, sólo se requieren las regiones variables de los anticuerpos, que pueden obtenerse tratando el anticuerpo con reactivos adecuados de manera que se generan partes Fab', Fab o F(ab')<sub>2</sub>. Dichos fragmentos son suficientes para uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican el acoplamiento de las partes inmunes específicas de inmunoglobulinas a reactivos de detección tales como radioisótopos.

[0080] La presente invención está dirigida además a polipéptidos aislados que forman los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención comprenden polipéptidos, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que codifican regiones de unión a antígeno específicas derivadas de moléculas de inmunoglobulina. Una secuencia polipeptídica o de aminoácidos "derivada de" una proteína designada se refiere al origen del polipéptido que tiene una determinada secuencia de aminoácidos. En determinados casos, la secuencia polipeptídica o de aminoácidos que deriva de una secuencia polipeptídica o de aminoácidos de partida particular tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la de la secuencia de partida, o una parte de ésta, en el que la parte consiste en al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos, al menos 30-50 aminoácidos o que un experto en la materia puede identificar de otra manera que tiene su origen en la secuencia de partida.

[0081] La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina, en la que las regiones VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 mostrados en la Tabla 4.

[0082] En otra realización, la solicitud proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina, en la que las regiones VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 mostrados en la Tabla 4, excepto por una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácidos en una cualquiera de las VH-CDR. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son conservativas.

[0083] La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina, en la que las regiones VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 mostrados en la Tabla 4.

[0084] En otra realización, la solicitud proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina, en la que las regiones VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 mostrados en la Tabla 4, excepto por una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácidos en una cualquiera de las VL-CDR. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son conservativas.

**[0085]** Una inmunoglobulina o su ADNc codificador puede modificarse adicionalmente. Así, en una realización adicional, el método de la presente invención comprende una cualquiera de la(s) etapa(s) de producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena única, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de uno cualquiera de los mismos. Los métodos correspondientes son conocidos para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Cuando los derivados de dichos anticuerpos se obtienen por la técnica de exposición en fagos, puede usarse la resonancia de plasmón superficial como se emplea en el sistema BIAcore para incrementar la eficacia de los anticuerpos de fago que se unen al mismo epítipo que el de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO89/09622. Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados se describe, por ejemplo, en la solicitud Europea EP-A1 0 239 400 y en la solicitud internacional WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos para utilizarse según la presente invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO 96/33735. Como se ha discutido anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de formas además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como en cadenas únicas; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO88/09344.

**[0086]** Los anticuerpos de la presente invención o su(s) cadena(s) de inmunoglobulina correspondientes pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delección o deleciones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones, adición o adiciones de aminoácidos y/o recombinación o recombinaciones y/o cualesquiera otra u otras modificaciones conocidas en la técnica bien solas o en combinación. Los métodos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son muy conocidos para el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de cadena lateral, modificaciones del núcleo y modificaciones N y C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación y la unión de restos de carbohidrato o lípido, cofactores y semejantes. Asimismo, la presente invención engloba la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino fusionado a una molécula heteróloga tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo carboxilo; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO00/30680 para los detalles técnicos correspondientes.

**[0087]** Según lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica una molécula de unión de la presente invención, en el caso del anticuerpo preferiblemente al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo como se ha descrito anteriormente. Típicamente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la VH y/o VL de la región variable de dicho anticuerpo. El experto en la materia sabe que cada dominio variable (VH de la cadena pesada y VL de la cadena ligera) de un anticuerpo comprende tres regiones hipervariables, denominadas algunas veces regiones determinantes de la complementariedad o "CDR" flanqueadas por cuatro regiones marco relativamente conservadas o "FR" y se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. Las regiones hipervariables o CDR del subtipo IgG humano de anticuerpo comprenden residuos de aminoácidos desde los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como describen Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991) y/o aquellos residuos de un bucle hipervariable, por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como describen Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917. Los residuos marco o FR son aquellos residuos del dominio variable distintos de y que rodean las regiones hipervariables. El término "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-7}$  o menos, y se une al antígeno predeterminado con una  $K_D$  que es al menos dos veces menor que su  $K_D$  para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína o cualquier otro polipéptido especificado) distinto del antígeno predeterminado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en la presente memoria con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno". Tal y como se usa en la presente memoria, la unión "altamente específica" significa que la  $K_D$  relativa del anticuerpo para el epítipo diana específico, por ejemplo, neoepítipo, es al menos 10 veces menor que la  $K_D$  para la unión del anticuerpo a otros ligandos o al equivalente nativo de la proteína asociada a enfermedad.

- 5 **[0088]** La afinidad o avidez de un anticuerpo para un antígeno puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions" En *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed., Raven Press Nueva York, NY (1984), Kuby, Janis *Immunology*, W.H. Freeman and Company Nueva York, NY (1992) y los métodos descritos en la presente memoria. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo para un antígeno incluyen ELISA, RIA y resonancia de plasmón superficial. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. Así, las medidas de la afinidad y otros parámetros de la unión del antígeno, por ejemplo,  $K_D$ ,  $CI_{50}$ , se hacen preferiblemente con disoluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno y un tampón estandarizado.
- 10 **[0089]** El experto en la materia entenderá fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito anteriormente puede usarse para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos con la especificidad y función biológica deseadas. Así, la presente invención también engloba polipéptidos y anticuerpos que comprenden al menos una CDR del dominio variable descrito anteriormente y que tiene ventajosamente sustancialmente las mismas propiedades de unión o similares que el anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos. El experto en la materia entenderá fácilmente que mediante el uso de los dominios variables o CDR descritos en la presente memoria se pueden construir anticuerpos según los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las solicitudes de patente europea EP 0 451 216 A1 y EP 0 549 581 A1. Además, el experto en la materia sabe que la afinidad de unión puede potenciarse haciendo sustituciones de aminoácidos en las CDR o en los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917) que se superponen parcialmente con las CDR según se define por Kabat. Así, la presente invención también se refiere a anticuerpos en los que una o más de las CDR mencionadas comprenden una o más, preferiblemente no más de dos, sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención comprende en una o ambas de sus cadenas de inmunoglobulina dos o las tres CDR de las regiones variables como se muestra en la Tabla 4.
- 25 **[0090]** Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, como conocen los expertos en la materia, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante de un anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a receptores en varias células a través de la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo engullimiento y destrucción de las partículas recubiertas por anticuerpo, aclaramiento de los complejos inmunes, lisis de las células diana recubiertas por anticuerpo por las células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.
- 30 **[0091]** Por consiguiente, determinadas realizaciones de la invención incluyen un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en el que al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante ha sido eliminada o alterada de otra manera de manera que se proporcionen características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerización no covalente, capacidad incrementada de localizarse en el sitio de un tumor, vida media sérica reducida o vida media sérica incrementada cuando se compara con un anticuerpo completo, inalterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, determinados anticuerpos para usarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria son anticuerpos con dominios eliminados que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen al menos de una parte de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en determinados anticuerpos, un dominio entero de la región constante del anticuerpo modificado estará eliminado, por ejemplo, todo o parte del dominio CH2 estará eliminado. En otras realizaciones, determinados anticuerpos para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG, que está alterada para eliminar la glicosilación, referida en otro lugar de la presente memoria como anticuerpos aglicosilados o "agli". Dichos anticuerpos "agli" pueden prepararse enzimáticamente así como por ingeniería del sitio o sitios de glicosilación consenso en la región constante. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría, se cree que los anticuerpos "agli" pueden tener un perfil incrementado de seguridad y estabilidad *in vivo*. Los métodos para producir anticuerpos aglicosilados, que tienen una función efectora deseada se encuentran, por ejemplo, en WO 2005/018572.
- 40 **[0092]** En determinados anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en la presente memoria, la parte Fc puede estar mutada para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la delección o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de
- 50
- 60

región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante incrementando de esta manera la localización tumoral. En otros casos puede ser que las modificaciones en la región constante consistentes con la presente invención, moderan la unión al complemento y reducen así la vida media sérica y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Otras modificaciones más de la región constante pueden usarse para modificar las uniones disulfuro o restos oligosacáridicos que permiten la localización aumentada debido a una especificidad de antígeno o flexibilidad del anticuerpo incrementadas. El perfil fisiológico, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como localización tumoral, biodistribución y vida media sérica, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas muy conocidas sin experimentación excesiva.

5  
10 **[0093]** Las formas modificadas de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden prepararse a partir de anticuerpos precursores o parentales completos usando técnicas conocidas en la técnica. Las técnicas de ejemplo se discuten con más detalle en la presente memoria.

15 **[0094]** En determinadas realizaciones tanto las regiones variables como constantes de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención son totalmente humanas. Los anticuerpos totalmente humanos pueden prepararse usando técnicas que son conocidas en la técnica y como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos totalmente humanos frente a un antígeno específico pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un pulso antigénico, pero cuyos loci endógenos se han inhabilitado. Las técnicas de ejemplo que pueden usarse para preparar dichos anticuerpos se describen en las patentes de Estados Unidos: 6.150.584; 6.458.592; 6.420.140. Otras técnicas son conocidas en la técnica. Los anticuerpos totalmente humanos pueden producirse asimismo por varias tecnologías de exposición, por ejemplo, exposición en fagos u otros sistemas de exposición virales, como se describe con más detalle en otro lugar de la presente memoria.

20  
25 **[0095]** Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden prepararse o fabricarse usando técnicas que son conocidas en la técnica. En determinadas realizaciones, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de éstas se "producen recombinantemente", es decir, se producen usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas de ejemplo para preparar moléculas de anticuerpo o fragmentos de éstas se discuten con más detalle en otro lugar de la presente memoria.

30  
35 **[0096]** Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también incluyen derivados que están modificados, por ejemplo, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de manera que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo cognado. Por ejemplo, pero no como limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de varias modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

40  
45 **[0097]** En determinadas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención no incitarán una respuesta inmune perjudicial en el animal que se va a tratar, por ejemplo, en un ser humano. En determinadas realizaciones, las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención derivan de un paciente, por ejemplo, un paciente humano y se usan posteriormente en la misma especie del que derivan, por ejemplo, ser humano, aliviando o minimizando la ocurrencia de respuestas inmunes perjudiciales.

50 **[0098]** La des-inmunización también puede usarse para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "des-inmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítopos de las células T (véanse, por ejemplo, WO9852976A1, WO0034317A2). Por ejemplo, se analizan las secuencias de VH y VL del anticuerpo de partida y se "mapea" un epítipo de células T humano para cada región V que muestra la localización de los epítopos respecto a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros residuos clave en la secuencia. Los epítopos de células T individuales del mapa de epítopos de células T se analizan con el fin de identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un riesgo bajo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña un rango de secuencias de VH y VL alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en un rango de polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos específicos de neoepítipo o fragmentos inmuno-específicos de los mismos para usarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria, que se ensayan entonces para función. Típicamente, se generan y ensayan entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes de cadena pesada y ligera completos que comprenden regiones modificadas V y C humanas se clonan en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se

introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos completos. Los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados y se identifica la variante óptima.

5 **[0099]** Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de exposición en fagos o una combinación de éstas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en la presente memoria no está limitado a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método por el que se produce. Así, el término "anticuerpo monoclonal" no está limitado a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención derivan de células B humanas que se han inmortalizado mediante transformación con el virus de Epstein-Barr, como se describe en la presente memoria.

20 **[0100]** En el proceso muy conocido de hibridoma (Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975)) los linfocitos con una vida relativamente corta o mortales de un mamífero, por ejemplo, células B derivadas de un sujeto humano como se describe en la presente memoria, se fusionan con una línea celular tumoral inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma), produciendo así células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas únicas por selección, dilución y recrecimiento comprendiendo cada cepa individual genes específicos para la formación de un único anticuerpo. Producen anticuerpos que son homogéneos frente a un antígeno deseado y, respecto a su linaje genético puro, se denominan "monoclonales".

25 **[0101]** Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma no fusionadas, parentales. Los expertos en la materia entenderán que los reactivos, líneas celulares y medios para la formación, selección y crecimiento de los hibridomas están disponibles comercialmente a partir de varias fuentes y protocolos estandarizados muy establecidos. Generalmente, el medio de cultivo en el que se crecen las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales frente al antígeno deseado. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por ensayos *in vitro* tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o ensayos de unión a neoepítipo como se describe en la presente memoria. Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y crecerse por métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, p 59-103 (1986)). Se entenderá además que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero por procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína-A, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

45 **[0102]** Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> pueden producirse recombinantemente o por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

50 **[0103]** Los anticuerpos completamente humanos, tales como los descritos en la presente memoria, son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de exposición en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también, patente de Estados Unidos Nos. 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Los anticuerpos humanos de la presente invención se aíslan, por ejemplo de pacientes que no tienen síntomas pero que presentan el riesgo de desarrollar un trastorno, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o un paciente con el trastorno pero con un curso de la enfermedad excepcionalmente estable.

60 **[0104]** En otra realización, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales deseados puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede

ponerse en vectores de expresión, que se transfectan en células huésped procariontas o eucariotas tales como, pero no limitado a, células de *E.coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma las inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético como se describe en la presente memoria) puede usarse para clonar secuencias de región constante y variable para la fabricación de anticuerpos como se describe en Newman *et al.*, patente de Estados Unidos No. 5.658.570, presentada el 25 de enero, 1995. Esencialmente, esto conlleva la extracción de ARN de las células seleccionadas, conversión a ADNc y amplificación por PCR usando cebadores específicos de Ig. Los cebadores adecuados para este propósito también se describen en la patente de Estados Unidos No. 5.658.570. Como se discutirá con más detalle más adelante, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado pueden crecerse en cantidades relativamente grandes para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

**[0105]** En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada y/o ligera pueden inspeccionarse para identificar las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) por métodos que son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de la cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas de ADN recombinante rutinarias, una o más de las CDR pueden insertarse en regiones marco, por ejemplo, en regiones marco humanas. Las regiones marco pueden ser naturales o regiones marco consenso y preferiblemente regiones marco humanas (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998) para un listado de regiones marco humanas). En determinadas realizaciones, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente al menos a un epítipo de un polipéptido deseado. En determinadas realizaciones, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones marco, por ejemplo, para mejorar la unión del anticuerpo a su antígeno. Además, dichos métodos pueden usarse para preparar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracadena. Otras alteraciones en el polinucleótido están englobadas por la presente invención y se encuentran en la técnica.

**[0106]** Alternativamente, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patente de Estados Unidos No. 4.694.778; Bird, *Science* 242: 423-442 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988); y Ward *et al.*, *Nature* 334: 544-554 (1989)) para producir anticuerpos de cadena única. Los anticuerpos de cadena única se forman por la unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácido, lo que resulta en un anticuerpo de cadena única. También pueden usarse las técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, *Science* 242: 1038-1041 (1988)).

**[0107]** En otra realización, los linfocitos pueden seleccionarse por micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, pueden aislarse células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, por ejemplo, un ser humano, y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden cribarse para IgG específicas que cumplan los criterios del cribado. Las células de pocillos positivos pueden aislarse. Las células B productoras de Ig individuales pueden aislarse por FACS o identificándolas en un ensayo en placa hemolítico mediado por complemento. Las células B productoras de Ig pueden micromanipularse en un tubo y los genes VH y VL pueden amplificarse usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes VH y VL pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpo y transferirse a células (por ejemplo, células eucariotas o procariontas) para expresión.

**[0108]** Alternativamente, las líneas celulares productoras de anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse usando técnicas muy conocidas para el experto en la materia. Dichas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones importantes. A este respecto, las técnicas adecuadas para uso en la invención como se describe más adelante se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).

**[0109]** Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o, preferiblemente, por técnicas de expresión recombinante como se describe en la presente memoria.

**[0110]** En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una región constante sintética en la que uno o más dominios están parcialmente o totalmente eliminados ("anticuerpos con dominio eliminado"). En determinadas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones o variantes con dominio eliminado en los se ha eliminado el dominio CH2 entero (construcciones  $\Delta$ CH2). Para otras realizaciones, puede utilizarse un péptido conector corto para sustituir el dominio eliminado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento a la región variable. Los expertos en la materia entenderán que dichas construcciones son particularmente preferidas debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 en la velocidad catabólica del anticuerpo. Las construcciones con dominio eliminado pueden derivarse usando un

vector que codifica un dominio constante humano de IgG<sub>1</sub> (véase, por ejemplo, WO 02/060955 A2 y WO02/096948A2). Este vector se prepara por ingeniería para eliminar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante de IgG<sub>1</sub> con dominio eliminado.

5 **[0111]** En determinadas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención son minicuerpos. Los minicuerpos pueden prepararse usando métodos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.837.821 o WO 94/09817A1).

10 **[0112]** En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene delección o sustitución de unos pocos o incluso un único aminoácido siempre que permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y de esta manera incrementar la localización tumoral. De manera similar, puede ser deseable eliminar simplemente la parte de uno o más dominios de región constante que controla la función efectora (por ejemplo, unión del complemento) que se va a modular. Dichas delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero) mientras deja otras funciones deseables asociadas con el dominio de región constante sujeto intactas. Además, como se ha aludido anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que aumenta el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible disrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Otras realizaciones adicionales comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para aumentar características deseables tales como función efectora o proporcionar más unión de citotoxina o carbohidrato. En dichas realizaciones, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

25 **[0113]** La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones VH y/o regiones VL) descritas en la presente memoria, uniéndose inmuno-específicamente estos anticuerpos o fragmentos de los mismos a un polipéptido asociado con un trastorno o fragmento o variante del mismo. Las técnicas estándar conocidas para los expertos en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR que resultan en sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto a la región VH de referencia, VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, región VL, VL-CDR1, VL-CDR2 o VL-CDR3. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para actividad biológica para identificar los mutantes que retienen la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido asociado con un trastorno).

50 **[0114]** Por ejemplo, es posible introducir mutaciones sólo en las regiones marco o sólo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones silenciosas o sustitutivas neutras, es decir, no tienen ningún efecto o tienen poco efecto en la capacidad de un anticuerpo de unirse al antígeno, de hecho algunas de dichas mutaciones no alteran la secuencia de aminoácidos de ninguna manera. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un híbrido. Las regiones codificadoras con codones optimizados que codifican los anticuerpos de la presente invención se describen en otro lugar de la presente memoria. Alternativamente, las mutaciones sustitutivas no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo de unirse al antígeno. La localización de la mayor parte de las mutaciones silenciosas y sustitutivas neutras probablemente sea en las regiones marco, mientras que la localización de la mayor parte de las mutaciones sustitutivas no neutras probablemente sea en CDR, aunque esto no es un requerimiento absoluto. Un experto en la materia será capaz de diseñar y ensayar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como ausencia de alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al

antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse rutinariamente y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad de unirse inmunoespecíficamente al menos a un epítipo de un polipéptido asociado con un trastorno) puede determinarse usando técnicas descritas en la presente memoria o modificando rutinariamente técnicas conocidas en la técnica.

5

#### IV. Polinucleótidos que codifican anticuerpos

**[0115]** Según lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica una molécula de unión de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo. En el caso del anticuerpo, el polinucleótido puede codificar al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. El polinucleótido de la invención que codifica el anticuerpo descrito anteriormente, puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN producido sintéticamente o una molécula de ácido nucleico quimérico producida recombinantemente que comprende cualquiera de estos polinucleótidos bien solo o en combinación. Preferiblemente, dicho polinucleótido es parte de un vector. Dichos vectores pueden comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permiten la selección de dicho vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas. Preferiblemente, el polinucleótido de la invención está unido de manera operativa a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procariotas o eucariotas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un ARNm que se puede traducir. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en células eucariotas, preferiblemente células de mamífero, son muy conocidos para los expertos en la materia. Habitualmente comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción así como de la traducción y/o regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas.

10

15

20

25

30

35

**[0116]** Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede contener una o más bases modificadas o núcleos de ADN o ARN modificados para estabilidad o para otras razones. Bases "modificadas" incluye, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Pueden hacerse una variedad de modificaciones en el ADN y ARN; así, "polinucleótido" engloba las formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente.

40

45

**[0117]** Puede crearse un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una parte de cadena pesada o parte de cadena ligera de inmunoglobulina) introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse por técnicas estándar, tal como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se hacen sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales.

50

**[0118]** Como es bien conocido, el ARN puede aislarse de las células de hibridoma originales o de otras células transformadas por técnicas estándar, tales como extracción con isotiocianato de guanidinio y precipitación seguido de centrifugación o cromatografía. Cuando es deseable, el ARNm puede aislarse del ARN total por técnicas estándar tales como cromatografía en oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas son familiares en la técnica.

55

**[0119]** En una realización, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo pueden prepararse, bien simultáneamente o separadamente, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa según métodos muy conocidos. La PCR puede iniciarse con cebadores de región constante consenso o con cebadores más específicos basados en las secuencias publicadas de ADN y aminoácidos de la cadena pesada y ligera. Como se ha discutido anteriormente, la PCR también puede usarse para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas pueden cribarse con cebadores consenso o sondas homólogas mayores, tales como sondas de región constante de ratón.

60

**[0120]** El ADN, típicamente ADN plasmídico, puede aislarse de las células usando técnicas conocidas en la técnica, mapearse por restricción y secuenciarse según técnicas estándar muy conocidas mostradas con detalle, por ejemplo, en

las referencias anteriores referentes a técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético según la presente invención en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o análisis posterior.

5 **[0121]** La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL), que tiene secuencias polipeptídicas VL-CDR1, VL-CDR2 o VL-CDR3 mostradas en la Tabla 4.

10 **[0122]** La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH), en la que las regiones VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 mostrados en la Tabla 4.

**Tabla 5:** Secuencias polinucleotídicas de la región VH de anticuerpos específicos de Abeta.

Anticuerpo	Secuencia variable de cadena pesada
NI-101.11 (SEQ ID NO:56)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGTGGAACTAAAAATACTATACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (SEQ ID NO:5)  (con codones optimizados)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGCGTGGTGCAGCCCGGCCGGAGCCTGCGGCTGAG CTGCGCCGCCAGCGGCTTCGCCTTCAGCAGCTACGGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGG CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCGTGATCTGGTTCGACGGCACCAAGAAGTACTACACCGACAGC GTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCCGGGACCGGGGCATCGGCGCCCGG CGGGGCCCTACTACATGGACGTGTGGGGCAAGGGCACCACCGTGACCCTGAGCAGC

15 **Tabla 6:** Secuencias polinucleotídicas de la región VL de anticuerpos específicos de Abeta.

Anticuerpo	Secuencia variable de la cadena ligera (kappa o lambda)
NI-101.11 (SEQ ID NO:7)	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTATTACT GTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGTAC G

20 **[0123]** A este respecto, el experto en la materia entenderá fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina o sólo una. Asimismo, dichos polinucleótidos pueden estar bajo el control del mismo promotor o pueden estar controlados separadamente para expresión. Los elementos reguladores posibles que permiten la expresión en células huésped procariontes comprenden, por ejemplo, el promotor PL, lac, trp o tac en E. coli y los ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor CMV, SV40, RSV, potenciador CMV, potenciador SV40 o un intrón de globina en células de mamíferos y otros animales. Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli.A de SV40 o el sitio poli.A de tk, aguas abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, pueden añadirse a la secuencia codificadora del polinucleótido de la invención secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo al medio y son muy conocidas en la técnica. La o las secuencias líder se ensamblan en la fase apropiada con las secuencias de traducción, inicio y terminación, y, preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una parte de ésta, en el espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un

péptido de identificación C o N-terminal que confiere características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto, en la técnica se conocen vectores de expresión adecuados tales como vector de expresión de ADNc Okayama-Berg pCDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) o pSPORT1 (GIBCO BRL). Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas de promotor eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control para huéspedes procariontes. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias nucleotídicas, y, si se desea, puede seguir la recogida y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada de inmunoglobulina o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina; véase, Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979).

**[0124]** La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en otra parte. Además, los polinucleótidos que codifican polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en la presente memoria, también están contemplados por la invención.

**[0125]** Los polinucleótidos pueden producirse o fabricarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia nucleotídica del anticuerpo es conocida, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier *et al.*, *BioTechniques* 17: 242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridar y ligar estos oligonucleótidos y amplificar los oligonucleótidos ligados por PCR.

**[0126]** Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede generarse a partir de un ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado a partir de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo específico de neoantígeno, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) por amplificación con PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular que se quiere identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método muy conocido en la técnica.

**[0127]** Una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, su secuencia de nucleótidos puede manipularse usando métodos muy conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

#### V. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

**[0128]** La presente invención también implica un método para producir células capaces de expresar un anticuerpo de la invención o su o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes que comprende modificar células por ingeniería genética con el polinucleótido o con el vector de la invención. Las células que se pueden obtener con el método de la invención pueden usarse, por ejemplo, para ensayar la interacción del anticuerpo de la invención con su antígeno.

**[0129]** Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos se insertan típicamente en un vector de expresión para introducción en células huésped que pueden usarse para producir la cantidad deseada de anticuerpo.

**[0130]** En la presente memoria, se describe la expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o parte del mismo (que preferiblemente contiene el dominio variable de cadena pesada o ligera) de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas muy conocidas en la técnica. Así, los métodos para preparar una proteína mediante la

expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo se describen en la presente memoria. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo y señales apropiadas de control de la transcripción y traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La descripción proporciona así vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unida de manera operativa a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 86/05807; Publicación PCT WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos No. 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para expresión de la cadena pesada o ligera completa.

**[0131]** La presente invención se refiere a vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden un polinucleótido que codifica el antígeno o preferiblemente un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención; opcionalmente en combinación con un polinucleótido de la invención que codifica el dominio variable de la otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia de genes o de direccionamiento. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus de vaccinia, virus adeno-asociados, virus del herpes o virus del papiloma bovino pueden usarse para la administración de los polinucleótidos o vector de la invención en la población celular diana. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para los expertos en la materia para construir vectores virales recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativamente, los polinucleótidos y vectores de la invención pueden reconstituirse en liposomas para la administración a las células diana. Los vectores que contienen los polinucleótidos de la invención (por ejemplo, las secuencias codificadoras y secuencias de control de la expresión del o de los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina) pueden transferirse a la célula huésped por métodos muy conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza habitualmente para células procariontas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación pueden usarse para otros huéspedes celulares; véase Sambrook, *supra*.

**[0132]** El término "vector" o "vector de expresión" se usa en la presente memoria para significar vectores usados según la presente invención como un vehículo para introducir en y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como conocen los expertos en la materia, dichos vectores pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariontas.

**[0133]** Para los propósitos de esta invención, pueden emplearse numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que derivan de virus animales tales como virus de papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, virus de vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión a ribosomas internos. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de las células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxótrofo, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tal como cobre. El gen del marcador seleccionable pueden unirse directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducirse en la misma célula por cotransformación. También pueden necesitarse elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores, potenciadores y señales de terminación de la transcripción.

**[0134]** En realizaciones particularmente preferidas, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (preferiblemente humanos) sintéticos como se ha discutido anteriormente. En una realización, esto se efectúa usando un vector de expresión patentado de Biogen IDEC, Inc., referido como NEOSPLA (descrito en la patente de Estados Unidos 6.159.730). Este vector contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, el exón 1 y exón 2 de la neomicina fosfotransferasa, el gen de la dihidrofolato reductasa y secuencia líder. Se ha encontrado que este vector resulta en un nivel de expresión muy alto de anticuerpos después de la incorporación de los genes de la región variable y constante, transfección en células CHO, seguido de selección en medio que contiene G418 y amplificación con metotrexato. Por supuesto, puede usarse en la presente invención cualquier vector de expresión que sea capaz de incitar la expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no están limitados a, los plásmidos pcDNA3,

pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA) y el plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). En general, el cribado de grandes números de células transformadas para aquellas que expresan niveles adecuadamente altos de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina es experimentación rutinaria que puede llevarse a cabo, por ejemplo, con sistemas robóticos. Los sistemas de vectores también se enseñan en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.736.137 y 5.658.570, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad en la presente memoria. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, por ejemplo, > 30 pg/célula/día. Otros sistemas de vectores de ejemplo se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.413.777.

**[0135]** En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden expresarse usando construcciones policistrónicas tales como las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2003-0157641 A1, presentada el 18 de noviembre, 2002. En estos sistemas nuevos de expresión, pueden producirse múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de una única construcción policistrónica. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias IRES compatibles se describen en la patente de Estados Unidos No. 6.193.980. Los expertos en la materia entenderán que dichos sistemas de expresión pueden usarse para producir eficazmente el rango completo de anticuerpos descrito en la presente solicitud.

**[0136]** Más generalmente, una vez que se ha preparado el vector o secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo, el vector de expresión puede introducirse en una célula huésped apropiada. La introducción del plásmido en la célula huésped puede conseguirse por varias técnicas muy conocidas para los expertos en la materia. Éstas incluyen, pero no están limitadas a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN recubierto, microinyección e infección con virus intactos. Véase, Ridgway, A.A.G. "*Mammalian Expression Vectors*" Vectors, Rodríguez y Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Capítulo 24.2, p. 470-472 (1988). Típicamente, la introducción de plásmidos en el huésped es mediante electroporación. Las células huésped que albergan la construcción de expresión se crecen en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y cadenas pesadas y se ensayan para la síntesis de proteínas de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo de ejemplo incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de separación celular activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y semejantes.

**[0137]** El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para uso en los métodos descritos en la presente memoria. Así, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o una cadena pesada o ligera del mismo, unido de manera operativa a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto las cadenas pesada como ligera pueden co-expresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla más adelante.

**[0138]** La presente invención se refiere además a células huésped transformadas con un polinucleótido o vector de la invención. Dicha célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota. El polinucleótido o vector de la invención que está presente en la célula huésped puede integrarse en el genoma de la célula huésped o puede mantenerse extracromosómicamente. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, de planta, animal o humana. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, aquellas del género *Saccharomyces*, en particular aquellas de la especie *S. cerevisiae*. El término "procariota" se pretende que incluya a todas las bacterias que pueden transformarse o transfectarse con una molécula de ADN o ARN para la expresión de un anticuerpo de la invención o las cadenas de inmunoglobulina correspondientes. Los huéspedes procariotas pueden incluir bacterias gram negativas así como gram positivas tales como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. El término "eucariota" se pretende que incluya células de levadura, planta superior, de insecto y preferiblemente de mamífero, lo más preferiblemente células HEK 293, NSO y CHO. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina codificados por el polinucleótido de la presente invención pueden estar glicosilados o no glicosilados. Los anticuerpos de la invención o las cadenas de inmunoglobulina correspondientes también pueden incluir un residuo inicial del aminoácido metionina. Un polinucleótido de la invención puede usarse para transformar o transfectar el huésped usando cualquiera de las técnicas conocidas habitualmente para los expertos en la materia. Además, los métodos para preparar genes fusionados, unidos de manera operativa y expresarlos, por ejemplo, en células de mamífero y bacterias son muy conocidos en la técnica (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Las construcciones genéticas y los métodos descritos en ella pueden utilizarse para la expresión del anticuerpo de la invención o las cadenas de inmunoglobulina correspondientes en huéspedes eucariotas o procariotas. En general, se usan los vectores de expresión que contienen secuencias

promotoras que facilitan la transcripción eficaz del polinucleótido insertado en conexión con el huésped. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor y un terminador, así como genes específicos que son capaces de proporcionar la selección fenotípica de las células transformadas. Las células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y las células huésped para la expresión y secreción de inmunoglobulinas pueden obtenerse de varias fuentes, tal como la American Type Culture Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", Quinta edición (1985) Rockville, Maryland, EEUU. Además, pueden usarse animales transgénicos, preferiblemente mamíferos, que comprenden células de la invención, para la producción a gran escala del anticuerpo de la invención.

**[0139]** Así, en una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para la producción de una molécula de unión específica de una proteína asociada con un trastorno, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo, comprendiendo dicho método

(a) cultivar una célula como se ha descrito anteriormente; y

(b) aislar dicho antígeno, molécula de unión, anticuerpo o fragmento de unión o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo del cultivo.

**[0140]** Los huéspedes transformados pueden crecerse en fermentadores y cultivarse según técnicas conocidas en la técnica para conseguir un crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligera y pesada individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, pueden purificarse según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y semejantes; véase, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). El anticuerpo o sus cadena(s) de inmunoglobulina correspondientes de la invención pueden aislarse del medio de crecimiento, lisados celulares o fracciones de membrana celular. El aislamiento y purificación, por ejemplo, de anticuerpos expresados recombinantemente o cadenas de inmunoglobulina de la invención puede ser por cualquier medio convencional, tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, por ejemplo, frente a la región constante del anticuerpo de la invención. Será evidente para los expertos en la materia que los anticuerpos de la invención pueden acoplarse adicionalmente a otros restos, por ejemplo, para aplicaciones de direccionamiento de fármaco o formación de imágenes. Dicho acoplamiento puede realizarse químicamente después de la expresión del anticuerpo o antígeno en el sitio de la unión o el producto de acoplamiento puede prepararse por ingeniería en el anticuerpo o antígeno de la invención a nivel de ADN. Los ADN se expresan en un sistema huésped adecuado y las proteínas expresadas se recogen y renaturalizan, si es necesario.

**[0141]** Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras con al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad y lo más preferido 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los anticuerpos pueden usarse terapéuticamente (incluyendo extracorpóreamente) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo.

**[0142]** La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la misma expresión de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica los dos polipéptidos, de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se sitúa ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322: 52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197 (1980)). Las secuencias codificadoras para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

**[0143]** Tal y como se usa en la presente memoria, "células huésped" se refiere a células que albergan vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procesos para el aislamiento de anticuerpos a partir de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo a no ser que se especifique claramente otra cosa. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar bien a partir de la centrifugación de las células completas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

**[0144]** Puede utilizarse una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar moléculas de anticuerpo para uso en los métodos descritos en la presente memoria. Dichos sistemas huésped-expresión representan vehículos por los cuales las secuencias codificadoras de interés pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de nucleótidos codificadoras apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Éstas incluyen pero no están limitadas a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión

de levadura recombinantes que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia). Preferiblemente, se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor principal del gen intermedio temprano de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, *Gene* 45: 101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8: 2 (1990)).

**[0145]** La línea celular huésped usada para la expresión de proteínas tiene frecuentemente un origen animal; los expertos en la materia están acreditados con la capacidad de determinar preferentemente las líneas celulares huésped particulares que son las más adecuadas para que se exprese en ellas el producto génico deseado. Las líneas celulares huésped de ejemplo incluyen, pero no están limitadas a, CHO (Ovario de Hámster Chino), DG44 y DUXB11 (líneas de Ovario de Hámster Chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CV1 (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CV1 con antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de cría de hámster), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Se prefieren particularmente las células CHO. Las líneas celulares huésped están típicamente disponibles en servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o en la bibliografía publicada.

**[0146]** Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas o que modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación posteriores a la traducción de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico.

**[0147]** Para la producción con alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden prepararse por ingeniería líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células preparadas por ingeniería se crecen durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para preparar por ingeniería líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo.

**[0148]** Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo pero no limitado a los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, *Cell* 11: 223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202 (1992)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* 22: 817 1980) pueden emplearse en células tk-, hgprr- o aprt-, respectivamente. También, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77: 357 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); *TIB TECH* 11(5): 155-215 (mayo, 1993); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, *Gene* 30: 147 (1984)). Los métodos conocidos habitualmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y

en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150: 1 (1981).

5 [0149] Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden incrementarse por amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, Nueva York, Vol. 3. (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada con el gen de anticuerpo, también se incrementará la producción del anticuerpo (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3: 257 (1983)).

10 [0150] La producción *in vitro* permite el aumento de escala para proporcionar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular son conocidas en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo, en un reactor aireado o en un reactor con agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas o microlechos de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o se desea, las disoluciones de polipéptidos pueden purificarse por los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno-)afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferente de un polipéptido sintético de la región bisagra o antes de o posteriormente a la etapa de cromatografía HIC descrita en la presente memoria.

15 [0151] Los genes que codifican los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden expresarse en células no de mamífero tales como células de bacterias o insecto o levaduras o plantas. Las bacterias que captan fácilmente ácidos nucleicos incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Además se entenderá que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente se vuelven parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben aislarse, purificarse y ensamblarse en moléculas funcionales. Cuando se desean formas tetraivalentes de anticuerpos, las subunidades se auto-ensamblarán en anticuerpos tetraivalentes (WO02/096948A2).

20 [0152] En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se quiere producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no están limitados a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificadora lacZ de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509 (1989)); y semejantes. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas por adsorción y unión a una matriz de glutatión-lechos de agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa trombina o factor Xa de manera que el producto génico diana clonado puede liberarse del resto GST.

25 [0153] Además de los procariontes, también pueden usarse microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el usado más habitualmente entre los microorganismos eucariotas aunque varias cepas adicionales están disponibles habitualmente, por ejemplo, *Pichia pastoris*.

30 [0154] Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa habitualmente el plásmido YRp7, por ejemplo (Stinchcomb, *et al.*, *Nature* 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene* 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene* 10: 157 (1980)). Este plásmido contiene ya el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85: 12 (1977)). La presencia de la lesión trp1 como una característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano.

35 [0155] En un sistema de insecto, se usa típicamente el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificadora del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

5 [0156] Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado recombinantemente, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico por Proteína A y cromatografía de tamaño en columna), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Alternativamente, un método preferido para incrementar la afinidad de los anticuerpos de la descripción se describe en US 2002 0123057 A1.

#### VI. Proteínas de fusión y conjugados

10 [0157] Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender un dominio adicional, estando unido dicho dominio por enlaces covalentes o no covalentes. La unión puede estar basada en una fusión genética según los métodos conocidos en la técnica y descritos anteriormente o puede realizarse, por ejemplo, por entrecruzamiento químico como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO94/04686. El dominio adicional presente en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo de la invención puede estar unido preferentemente por un conector flexible, ventajosamente un conector polipeptídico, en el que dicho conector polipeptídico comprende aminoácidos plurales, hidrofílicos, unidos por enlace peptídico con una longitud suficiente como para abarcar la distancia entre el extremo C-terminal de dicho dominio adicional y el extremo N-terminal del anticuerpo de la invención o viceversa. El agente activo terapéuticamente o en diagnóstico puede acoplarse al anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo por varios medios. Éstos incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de cadena única que comprenden las regiones variables del anticuerpo de la invención acopladas por métodos covalentes, tales como enlaces peptídicos, al agente activo terapéuticamente o en diagnóstico. Los ejemplos adicionales incluyen moléculas que comprenden al menos un fragmento de unión a antígeno acoplado a moléculas adicionales covalentemente o no covalentemente que incluyen aquellas en la lista siguiente ilustrativa no limitativa. Traunecker, Int. J. Cancer Surp. SuDP 7 (1992), 51-52, describen el reactivo biespecífico janusina en el que la región Fv dirigida a CD3 está acoplada a CD4 soluble o a otros ligandos tales como OVCA e IL-7. De manera similar, las regiones variables del anticuerpo de la invención pueden construirse en moléculas Fv y acoplarse a ligandos alternativos tales como los ilustrados en el artículo citado. Higgins, J. Infect Disease 166 (1992), 198-202, describió un anticuerpo hetero-conjugado compuesto por OKT3 entrecruzado con un anticuerpo dirigido a una secuencia específica en la región V3 de GP120. Dichos anticuerpos hetero-conjugados también pueden construirse usando al menos las regiones variables contenidas en el anticuerpo de los métodos de la invención. Los ejemplos adicionales de anticuerpos específicos incluyen aquellos descritos por Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194 y por Fanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124.

35 [0158] En una realización adicional de la presente invención, la molécula de unión, anticuerpo, cadena de inmunoglobulina o un fragmento de unión del mismo o el antígeno se marca de forma detectable. Los agentes de marcaje pueden acoplarse bien directamente o indirectamente a los anticuerpos o antígenos de la invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto es por el uso de un resto espaciador.

40 [0159] Por lo tanto, la actividad biológica de las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos identificados aquí sugiere que tienen una afinidad suficiente como para hacerlos candidatos potenciales para la localización de fármacos en células que expresan las estructuras superficiales apropiadas de la célula y tejido enfermo, respectivamente. Este direccionamiento y unión a células podría ser útil para la administración de agentes activos terapéuticamente o en diagnóstico y terapia génica/administración de genes. Las moléculas/partículas con un anticuerpo de la invención se unirán específicamente a células/tejidos que expresan la forma variante de la proteína patológica y, por lo tanto, podrían tener un uso diagnóstico y terapéutico. Así, la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede marcarse (por ejemplo, fluorescente, radiactivo, enzima, magnético nuclear, metal pesado) y usarse para detectar dianas específicas *in vivo* o *in vitro* incluyendo ensayos del tipo "inmunoquímica" *in vitro*. *In vivo* podrían usarse de una manera similar a técnicas de formación de imágenes en medicina nuclear para detectar tejidos, células u otro material que expresa el neoepítipo. Así, en una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de una molécula de unión o un anticuerpo de la presente invención o fragmento de unión del mismo para la preparación de una composición para la detección *in vivo* de o direccionamiento de un agente terapéutico y/o de diagnóstico de una proteína asociada con un trastorno en el cerebro, detectar, suprimir la formación de o reducir los agregados o conformaciones de proteína patológica en un sujeto, para mejorar la cognición o retrasar o revertir el decline cognitivo asociado con enfermedades o para la extracción extracorpórea de compuestos patológicos o sus precursores de fluidos corporales.

55 [0160] En determinadas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos que normalmente no están asociados con un anticuerpo. Las modificaciones de ejemplo se describen con más detalle más adelante. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo fv de cadena única de la invención puede comprender una secuencia conectora flexible, o puede estar modificado para añadir un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina o un marcaje).

60

**[0161]** Un polipéptido de anticuerpo de la invención puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión diana y al menos una parte heteróloga, es decir, una parte con la que no está unida naturalmente en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se ponen en contacto en el polipéptido de fusión o que pueden existir normalmente en la misma proteína pero están situadas en una nueva reorganización en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión pueden crearse, por ejemplo, por síntesis química o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones del péptido están codificadas en la relación deseada.

**[0162]** El término "heterólogo" según se aplica a un polinucleótido o un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido deriva de una entidad distinta de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, tal y como se usa en la presente memoria, un "polipéptido heterólogo" que se va a fusionar a un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o análogo del mismo deriva de un polipéptido no de inmunoglobulina de la misma especie o un polipéptido de inmunoglobulina o no de inmunoglobulina de una especie diferente.

**[0163]** Como se discute con más detalle en otro lugar de la presente memoria, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse además recombinantemente a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden fusionarse o conjugarse recombinantemente a moléculas útiles como marcajes en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente de Estados Unidos No. 5.314.995; y EP 396.387.

**[0164]** Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los anticuerpos pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamiento posterior a la traducción, o por técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una bibliografía de investigación voluminosa. Las modificaciones pueden producirse en cualquier lugar en el anticuerpo, incluyendo el núcleo peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y el extremo amino o carboxilo, o en restos tales como carbohidratos. Se entenderá que puede estar presente el mismo tipo de modificación en el mismo grado o grados distintos en varios sitios en un anticuerpo dado. También, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales posteriores a la traducción o pueden prepararse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York, 2ª Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth Enzymol* 182: 626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 663: 48-62 (1992)).

**[0165]** La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo y un polipéptido heterólogo. En una realización, una proteína de fusión de la invención comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes de los mismos, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En otra realización, una proteína de fusión para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres de las VH-CDR de un anticuerpo, o fragmentos, variantes o derivados del mismo, o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres de las VL-CDR de un anticuerpo, o fragmentos, variantes o derivados del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En una realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una VH-CDR3 de un anticuerpo de la presente invención, o fragmento, derivado o variante del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga, en el que la proteína de fusión se une específicamente al menos a un neopéptido de una proteína asociada a un trastorno. En otra realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la

secuencia de aminoácidos de al menos una región VH de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos una región VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos, derivados o variantes de los mismos y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, las regiones VH y VL de la proteína de fusión corresponden a una única fuente de anticuerpo (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente al menos a un neoepítipo de una proteína asociada a un trastorno. En otra realización adicional, una proteína de fusión para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las CDR de VH de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las CDR de VL de un anticuerpo, o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las VH-CDR o VL-CDR corresponden a una única fuente de anticuerpo (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también están englobadas por la invención.

**[0166]** Las proteínas de fusión de ejemplo reportadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, *Nature* 337: 525-531 (1989); Traunecker *et al.*, *Nature* 339: 68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, *DNA Cell Biol. USA* 9: 347-353 (1990); y Byrn *et al.*, *Nature* 344: 667-670 (1990)); L-selectina (receptor de direccionamiento) (Watson *et al.*, *J. Cell. Biol.* 110: 2221-2229 (1990); y Watson *et al.*, *Nature* 349: 164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, *Cell* 61: 1303-1313 (1990)); CD28 y B7 (Linsley *et al.*, *J. Exp. Med* 173: 721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, *J. Exp. Med.* 174: 561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell* 66: 1133-1144 (1991)); receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 27: 2883-2886 (1991); y Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174: 1483-1489 (1991)); y receptor de IgE (Ridgway y Gorman, *J. Cell. Biol. Vol.* 115, Resumen No. 1448 (1991)).

**[0167]** Como se discute en otro lugar de la presente memoria, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse a polipéptidos heterólogos para incrementar la vida media *in vivo* de los polipéptidos o para uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, puede conjugarse PEG con los anticuerpos de la invención para incrementar su vida media *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, *Cytokine* 16: 106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54: 531 (2002); o Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions* 30: 512 (2002).

**[0168]** Además, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otras, muchas de las cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no están limitadas a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984)) y la etiqueta "flag".

**[0169]** Las proteínas de fusión pueden prepararse usando métodos que son muy conocidos en la técnica (véanse por ejemplo las patentes de Estados Unidos Nos. 5.116.964 y 5.225.538). El sitio preciso en el que se hace la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de secreción o unión de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión se transfiere a una célula huésped para expresión.

**[0170]** Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse con al menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana, o para formación de imágenes o terapia del paciente. Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden marcarse o conjugarse bien antes o después de la purificación, cuando se realiza purificación.

**[0171]** En particular, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

**[0172]** Los conjugados que son inmunotoxinas incluyendo anticuerpos convencionales se han descrito ampliamente en la técnica. Las toxinas pueden acoplarse a los anticuerpos por técnicas de acoplamiento convencionales o se pueden producir inmunotoxinas que contienen partes de toxina proteica como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse de una manera correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Son ilustrativas de dichas inmunotoxinas las descritas por Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 y por Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

5 [0173] La proteína de fusión descrita anteriormente puede comprender además un conector escindible o sitio de escisión para proteinasas. Estos restos espaciadores, a su vez, pueden ser insolubles o solubles (Diener *et al.*, Science 231 (1986), 148) y pueden seleccionarse para permitir la liberación del fármaco del antígeno en el sitio diana. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden acoplarse a los anticuerpos y antígenos de la presente invención para inmunoterapia son fármacos, radioisótopos, lectinas y toxinas. Los fármacos que pueden conjugarse con los anticuerpos y antígenos de la presente invención incluyen compuestos que se refieren clásicamente como fármacos tales como mitomicina C, daunorrubicina y vinblastina. En el uso de anticuerpos o antígenos conjugados radioisotópicamente de la invención, por ejemplo, para inmunoterapia, determinados isótopos pueden ser más preferibles que otros dependiendo de factores tales como distribución en leucocitos así como estabilidad y emisión. Dependiendo de la respuesta autoinmune, algunos emisores pueden ser preferibles respecto a otros. En general, para inmunoterapia se prefieren los radioisótopos que emiten partículas  $\alpha$  y  $\beta$ . Los preferidos son los emisores de corto rango y alta energía tales como  $^{212}\text{Bi}$ . Los ejemplos de radioisótopos que pueden unirse a los anticuerpos o antígenos de la invención para propósitos terapéuticos incluyen, pero no están limitados a  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{At}$ ,  $^{211}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$  y  $^{188}\text{Re}$ . Otros agentes terapéuticos que pueden acoplarse a la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, así como protocolos terapéuticos *ex vivo* e *in vivo* son conocidos o pueden averiguarse fácilmente por los expertos en la materia. Cuando sea apropiado, el experto en la materia puede usar un polinucleótido de la invención que codifica uno cualquiera de los anticuerpos, antígenos o los vectores correspondientes descritos anteriormente en lugar del material proteínico en sí mismo.

20 [0174] Los expertos en la materia entenderán que los conjugados también pueden ensamblarse usando una variedad de técnicas dependiendo del agente seleccionado que se va a conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión con un éster activado de biotina tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. De manera similar, los conjugados con un marcador fluorescente pueden prepararse en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, aquellos listados en la presente memoria, o por reacción con un isotiocianato, preferiblemente fluoresceína-isotiocianato. Los conjugados de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se preparan de una manera análoga.

30 [0175] La presente invención engloba además anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos pueden usarse en diagnóstico, por ejemplo, para monitorizar el desarrollo o progresión de una enfermedad neurológica como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un tratamiento y/o régimen de prevención dado. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando varias tomografías de emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnósticos según la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acuorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{99}\text{Tc}$ .

45 [0176] Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede marcarse de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo etiquetado con quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

50 [0177] Una de las formas en las que un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede marcarse de forma detectable es uniendo el mismo a una enzima y usando el producto unido en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quaterly Publication, Walkersville, Md., *Diagnostic Horizons* 2: 1-7 (1978)); Voller *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 31: 507-520 (1978); Butler, J.E., *Meth. Enzymol.* 73: 482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. *et al.*, (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kogaku Shoin, Tokio (1981). La enzima, que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente un sustrato cromogénico, de tal manera que produce un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar de forma detectable el anticuerpo incluyen, pero no están limitadas a, malato deshidrogenasa, nucleasa estaphylococcal, isomerasa delta-5-esteroide, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina,

asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Además, la detección puede conseguirse por métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede conseguirse por comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de manera similar.

5

**[0178]** La detección también puede conseguirse usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiactivamente el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, (marzo, 1986)). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios que incluyen, pero no están limitados a, un contador gamma, un contador de centelleo o autorradiografía.

10

**[0179]** Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede marcarse de forma detectable usando metales que emiten fluorescencia tales como  $^{152}\text{Eu}$ , u otros de la serie lantánido. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

15

**[0180]** Las técnicas para conjugar varios restos a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo son muy conocidas, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), Marcel Dekker, Inc., págs. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press págs. 303-16 (1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982).

20

25

**[0181]** En determinadas realizaciones, puede conjugarse un resto que potencie la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, por ejemplo, un polipéptido de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento inmunoespecífico del mismo. Por ejemplo, en una realización, puede conjugarse PEG a las moléculas de unión de la invención para incrementar su vida media *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, *Cytokine* 16: 106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54: 531 (2002); o Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions* 30: 512 (2002).

30

35

VII. Composiciones y métodos de uso

**[0182]** Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión mencionada anteriormente, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o derivados químicos del mismo, o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la presente invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "derivado químico" describe una molécula que contiene restos químicos adicionales que normalmente no son una parte de la molécula base. Dichos restos pueden mejorar la solubilidad, vida media, absorción, etc. de la molécula base. Alternativamente, los restos pueden atenuar efectos secundarios no deseables de la molécula base o disminuir la toxicidad de la molécula base. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales tales como interleuquinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Por ejemplo, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, el agente adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-Abeta y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, en una realización preferida particular, la presente invención se refiere al uso de la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o de una molécula de unión que tienen sustancialmente las mismas especificidades de unión de una cualquiera de éstas, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratar o prevenir la progresión de la enfermedad de Alzheimer; para la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer; para diagnosticar o cribar a un sujeto para la presencia de la enfermedad de Alzheimer o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Dicha composición farmacéutica puede diseñarse para ser administrada intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intranasalmente, parenteralmente o como un aerosol; véase también *infra*.

40

45

50

55

**[0183]** Una ventaja particular de la estrategia terapéutica de la presente invención se basa en el hecho de que los anticuerpos derivados de células B o células B de memoria de un organismo sano en fase preclínica o excepcionalmente estable clínicamente son, con una determinada probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad clínicamente manifiesta, o de disminuir el riesgo de la ocurrencia de una enfermedad clínicamente manifiesta o de retrasar el

60

momento de la ocurrencia de una enfermedad clínicamente manifiesta. Típicamente, dichos anticuerpos también han experimentado ya con éxito la maduración somática, es decir, la optimización respecto a la selectividad y eficacia en la unión de alta afinidad a la molécula diana mediante la variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

5 **[0184]** El conocimiento de que dichas células *in vivo*, por ejemplo en un ser humano, no se han activado mediante proteínas fisiológicas relacionadas u otras o estructuras celulares en el sentido de una reacción autoinmunitaria o alérgica también tiene una gran importancia médica ya que esto significa una probabilidad considerablemente incrementada de viabilidad exitosa durante las fases del ensayo clínico. Por así decirlo, la eficacia, aceptabilidad y tolerabilidad se han demostrado ya antes del desarrollo preclínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en al menos un sujeto humano. Así, puede esperarse que, con un procedimiento según la presente invención, tanto la eficacia específica de la estructura de la diana de un anticuerpo como agente terapéutico como su probabilidad disminuida de efectos secundarios incrementan significativamente su probabilidad de éxito en clínica.

15 **[0185]** A partir de lo anterior, es evidente que la presente invención engloba cualquier uso de una molécula de unión específica de enfermedad que comprende al menos una CDR del anticuerpo descrito anteriormente, en particular para el diagnóstico y/o tratamiento de un trastorno relacionado con la enfermedad de Alzheimer y deposición de Abeta, respectivamente. Preferiblemente, dicha molécula de unión es un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo. Además, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-idiotípicos de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados descritos anteriormente en la presente memoria. Éstos son anticuerpos u otras moléculas de unión que se unen a la secuencia peptídica antigénica única localizada en la región variable de un anticuerpo cerca del sitio de unión del antígeno.

25 **[0186]** En otra realización, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende una cualquiera de las moléculas de unión, anticuerpos, fragmento de unión a antígeno, polinucleótidos, vectores o células descritos anteriormente de la invención y opcionalmente medios adecuados para la detección tales como reactivos usados convencionalmente en métodos de diagnóstico basados en el sistema inmune o ácido nucleico. Los anticuerpos de la invención son adecuados, por ejemplo, para uso en inmunoensayos en los que pueden utilizarse en fase líquida o unidos a un vehículo de fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos bien en formato directo o indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), sandwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de transferencia Western. Los antígenos y anticuerpos de la invención pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para aislar células específicamente unidas a ellos. Los ejemplos de vehículos muy conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Existen muchos marcadores y métodos de marcaje diferentes conocidos para los expertos en la materia. Los ejemplos de los tipos de marcajes que pueden usarse en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véanse también las realizaciones discutidas anteriormente en la presente memoria.

40 **[0187]** Por una realización adicional, las moléculas de unión, en particular anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en un método para el diagnóstico de un trastorno en un individuo obteniendo una muestra de fluido corporal del individuo ensayado que puede ser una muestra de sangre, una muestra linfática o cualquier otra muestra de fluido corporal y poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno. El nivel de dichos complejos se determina por métodos conocidos en la técnica, indicando un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra control la enfermedad en el individuo ensayado. De la misma manera, también puede usarse el antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención. Así, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

50 **[0188]** En este contexto, la presente invención también se refiere a medios diseñados específicamente para este propósito. Por ejemplo, puede usarse una matriz basada en proteína o anticuerpos, que se carga por ejemplo con antígenos derivados de la proteína asociada a trastorno mencionada y que contiene el neoepítipo con el fin de detectar autoanticuerpos que pueden estar presentes en pacientes que padecen, por ejemplo, un trastorno neurológico, en particular la enfermedad de Alzheimer, o con anticuerpos o moléculas de unión a antígeno equivalentes de la presente invención que reconocen específicamente una cualquiera de estas proteínas. Por ejemplo, la obtención de perfiles de antígenos en micromatriz de autoanticuerpos en artritis reumatoide se ha reportado por Hueber *et al.*, *Arthritis Rheum.* 52 (2005), 2645-2655. El diseño de inmunoensayos en micromatriz se resume en Kusnezow *et al.*, *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. De acuerdo con esto, la presente invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de unión o antígenos identificados según la presente invención.

60

5 [0189] La presente invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico y de diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más contenedores rellenos con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, por ejemplo, molécula de unión, anticuerpo o fragmento de unión del mismo, antígeno, polinucleótido, vector o célula de la presente invención. Asociado con dicho o dichos contenedores puede haber una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana. Además o alternativamente, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para el uso en ensayos de diagnóstico apropiados. La composición, por ejemplo, kit de la presente invención es por supuesto particularmente adecuada para el diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno que está acompañado de la presencia de una proteína asociada con un trastorno como se ha definido anteriormente, especialmente amiloidosis, y en particular aplicable para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (AD).

15 [0190] Los términos "tratamiento", "tratar" y semejantes se usan en la presente memoria para significar generalmente obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o parcialmente una enfermedad o síntoma de ésta y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcialmente o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" tal y como se usa en la presente memoria cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir la ocurrencia de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, por ejemplo, parar su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, por ejemplo, causar la regresión de la enfermedad.

[0191] Además, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano, que necesita tratamiento para una afección, trastorno o enfermedad.

25 [0192] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse según métodos muy conocidos en la técnica; véase por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) por la University of Sciences en Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse por métodos muy conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede realizarse por diferentes vías, por ejemplo, por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Las formulaciones en aerosol tales como formulaciones por pulverización nasal incluyen disoluciones acuosas purificadas u otras disoluciones del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Dichas formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y estado isotónico compatibles con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio con un vehículo adecuado.

35 [0193] Además, mientras la presente invención incluye el procedimiento ahora estándar (aunque afortunadamente infrecuente) de perforar un pequeño agujero en el cerebro para administrar un fármaco de la presente invención, en un aspecto preferido, la molécula de unión, especialmente anticuerpo o fármaco basado en anticuerpo de la presente invención puede cruzar la barrera hemato-encefálica, lo que permite la administración intravenosa u oral.

40 [0194] El régimen de dosificación será determinado por el médico responsable y factores clínicos. Como es muy conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área corporal superficial, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y ruta de administración, salud general, y otros fármacos que se administran simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1.000 µg (o de ácido nucleico para la expresión o para la inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, se consideran las dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. Generalmente, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente 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 ó 10 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 1-10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén en el alcance de la invención. Dichas dosis pueden administrarse a los sujetos diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquier otro esquema determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar conlleva la administración en dosificaciones múltiples durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento de ejemplo adicionales conllevan la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los esquemas de dosificación de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg ó 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos ó 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpos administrado está en los intervalos indicados. El progreso puede monitorizarse por evaluación periódica. Las

preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propileno glicol, polietileno glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y semejantes. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y semejantes. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Además, la composición farmacéutica también puede formularse como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti-A $\beta$  para inmunización pasiva.

**[0195]** Además, puede ser deseable la co-administración o administración secuencial de otros agentes. Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad del ingrediente activo suficiente para mejorar los síntomas o afección. La eficacia terapéutica y toxicidad de dichos compuestos pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Preferiblemente, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para restaurar el comportamiento y/o las propiedades cognitivas normales en el caso de la enfermedad de Alzheimer.

**[0196]** Éstas y otras realizaciones se describen y están englobadas por la descripción y los ejemplos de la presente invención. La bibliografía adicional que se refiere a uno cualquiera de los materiales, métodos, usos y compuestos que se van a emplear según la presente invención puede obtenerse de bibliotecas y bases de datos públicas, usando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública "Medline", que está organizada por el National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine en el National Institutes of Health. Las bases de datos adicionales y direcciones de red, tales como aquellas del European Bioinformatics Institute (EBI), que es parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) son conocidas para el experto en la materia y también pueden obtenerse usando motores de búsqueda de internet. Una visión global de la información de patentes en biotecnología y una visión general de fuentes relevantes de información de patentes útil para una búsqueda retrospectiva y para percatación actual se proporciona en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

**[0197]** La descripción anterior describe generalmente la presente invención. A no ser que se indique otra cosa, a un término según se usa en la presente memoria se le proporciona la definición según se proporciona en el Diccionario de Oxford de Bioquímica y Biología Molecular, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reeditado en 2003, ISBN 0 19 850673 2. A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. Las citas bibliográficas completas pueden encontrarse al final de la especificación inmediatamente antes de las reivindicaciones.

**[0198]** Puede obtenerse una comprensión más completa por referencia a los ejemplos específicos siguientes que se proporcionan en la presente memoria sólo para propósitos de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

### Ejemplos

**[0199]** Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención, pero no debería considerarse que limitan el alcance de la invención de ninguna manera. Las descripciones detalladas de los métodos convencionales, tales como los empleados en la presente memoria pueden encontrarse en la bibliografía citada; véase también "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Decimotercera Ed. ed por Beers y Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

**[0200]** La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Para una elaboración adicional de técnicas generales útiles en la práctica de esta invención, el médico puede referirse a libros de texto estándar y revisiones en biología celular y cultivo tisular; véanse también las referencias citadas en los ejemplos. Los métodos generales en bioquímica molecular y celular pueden encontrarse en libros de texto estándar tales como Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames y Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames y Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney y Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller y Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (Ausubel *et al.*, eds.); y

Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu *et al.*, eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner *et al.*, eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt y Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle y Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genética referidos en esta descripción están disponibles de proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich y ClonTech. Las técnicas generales en cultivo celular y la recogida de medios se plantean en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch *et al.*, Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA Arrays, Herzelt *et al.*, CHAOS 11 (2001), 98-107.

**[0201]** Los experimentos siguientes se ilustran y describen respecto al anticuerpo NI-101.11. Sin embargo, el anticuerpo NI-101.10 es estructuralmente similar y puede esperarse así que proporcione resultados comparables.

## 20 Métodos suplementarios

### ELISA

**[0202]** Se recubrieron Microplacas de 96 pocillos de mitad de área (Corning) con péptido Abeta sintético a una concentración estándar de 1 µg/ml en tampón de recubrimiento (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,42) toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron y los sitios de unión no específica se bloquearon durante 1h a RT con PBS que contenía 2% BSA (Sigma, Buchs, Suiza). Se transfirió medio condicionado de células B de placas de cultivo de células B de memoria a las placas de ELISA y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La unión de los anticuerpos humanos se determinó usando anticuerpos policlonales anti-IgG humana de burro conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Reino Unido) seguido de la medida de la actividad HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

### Clonación molecular de anticuerpos que presentan la especificidad de interés

**[0203]** Se recogen células B vivas de cultivos de células B de memoria seleccionados usando un separador celular. Se prepara ARNm y se obtienen las secuencias de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina usando cebadores específicos de marco de Ig para todas las familias marco 1 (FR1) de cadena pesada y ligera variables humanas como cebadores 5' en combinación con cebadores específicos para todos los segmentos J-H humanos como cebadores 3' (Marks *et al.*, Mol. Biol. 222 (1991), 581-597). Alternativamente, puede usarse RT-PCR de célula única de células separadas únicas del cultivo de células B de memoria como fuente de secuencias de cadena pesada y ligera de Ig (Babcock *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 7843-7848; Brezinschek *et al.*, J. Immunol. 155 (1995), 190-202; Coronella *et al.*, Nucleic Acids Research 28 (2000); Owens *et al.*, J. Immunol. 171 (2003), 2725-2733). La separación de células únicas conserva el emparejamiento correcto de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina de los clones de anticuerpo producidos originalmente en el cultivo de células B.

**[0204]** La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se realiza por re-cribado en micromatriz tisular compatible con microtitulación y ELISA después de la expresión recombinante de los anticuerpos completos. La expresión recombinante de los anticuerpos IgG1 completos se consigue después de la inserción de las secuencias variables de cadena pesada y ligera "en el marco de lectura correcto" en los vectores de expresión que complementan la secuencia de región variable con una secuencia que codifica un péptido señal en el extremo 5-prima y en el extremo 3' con una secuencia que codifica el o los dominios constantes apropiados. Para este fin, los cebadores contenían sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de las secuencias variables de cadena pesada y ligera en vectores de expresión de anticuerpos. La inmunoglobulina de cadena pesada se expresa insertando el producto de RT-PCR de cadena pesada de inmunoglobulina en marco en un vector de expresión de cadena pesada que porta un péptido señal y los dominios constantes de inmunoglobulina humana. La inmunoglobulina de cadena ligera kappa se expresa insertando el producto de RT-PCR de cadena ligera kappa en marco en un vector de expresión de cadena ligera que proporciona un péptido señal y el dominio constante 1 de la inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana. Alternativamente, la inmunoglobulina de cadena ligera lambda se expresa insertando el producto de RT-PCR de la cadena ligera lambda en marco en un vector de expresión de cadena ligera lambda que proporciona un péptido señal y el dominio constante 1 de la inmunoglobulina de cadena ligera lambda humana.

**[0205]** Los anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales se obtienen después de la co-transfección en células HEK 293 (o cualquier otra línea celular receptora apropiada) de un vector de expresión de cadena pesada de Ig y un vector de expresión de cadena ligera kappa o lambda de Ig. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se purifica posteriormente del medio condicionado usando una purificación en columna con Proteína A estándar. El anticuerpo monoclonal humano recombinante puede producirse en cantidades ilimitadas usando células transfectadas temporalmente o de manera estable. Las líneas celulares que producen el anticuerpo monoclonal humano recombinante pueden establecerse usando los vectores de expresión de Ig directamente o re-clonando las regiones variables de Ig en vectores de expresión diferentes. Los derivados tales como F(ab), F(ab)<sub>2</sub> y scFv también pueden generarse a partir de estas regiones variables de Ig.

*Protocolo experimental:*

*RT-PCR de células B en masa*

**[0206]** Las células vivas según se identificaron por sus propiedades de dispersión de la luz frontal y lateral de cultivos de células B de memoria seleccionados se separaron en alícuotas de 100-2.000 células directamente en tubos de PCR de 0,2 ml llenos con 20 µl de RNAlater (Ambion, Huntingdon, Reino Unido) usando un separador celular MoFlo. Se preparó ARNm usando el Micro Kit mRNA-Direct (Dyna, Invitrogen, Basilea, Suiza). Se preparó ADNc usando el Kit "RT para PCR" (Clontech Becton Dickinson, Basilea, Suiza) y la PCR de las secuencias variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina (Ig) se realizó usando el Kit de PCR Advantage 2 (Clontech) usando cebadores específicos para todas las familias de marco 1 (FR1) de cadena variable pesada y ligera humana como cebadores 5' en combinación con cebadores específicos para los dominios constantes de cadenas pesadas de Ig humana o ligeras kappa de Ig o ligeras lambda de Ig como cebadores 3'. Los cebadores se adquirieron en Microsynth (Balgach, Suiza).

**[0207]** Un péptido señal que se usó en todos los vectores de expresión se obtuvo de la secuencia de la familia 1 L5 de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana (MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRS; SEQ ID NO: 2) como se describe en la V-Base y diseñado para proporcionar el sitio de restricción Xba 1 con el fin de facilitar la clonación de las regiones variables amplificadas por PCR ATGGACATGCGGGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGTGGTTCCCGGCTCTA GATGC; SEQ ID NO: 1). Xba1 se introdujo por mutagénesis silenciosa. Como un sitio de restricción 3' usado para la clonación de las regiones variables de cadena pesada, se introdujo el sitio de restricción Sal1 en C1 de IgG1 proporcionado por el vector. De manera similar, se introdujo el sitio de restricción BsiW1 en C1 de la cadena ligera kappa y se introdujo Xho1 en C1 de la cadena ligera lambda. La digestión por restricción de los productos de PCR y la ligación en vectores receptores se realizó según procedimientos estándar. Se preparó ADN plasmídico usando kits estándar (Qiagen, Hombrechtikon, Suiza). Los vectores receptores contenían un promotor CMV para la expresión de los genes de anticuerpo en células de mamífero.

Expresión de anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales

**[0208]** Los anticuerpos pueden producirse en cantidades suficientes por expresión recombinante usando tecnologías conocidas en la técnica (Trill *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 6 (1995), 553-601). El anticuerpo monoclonal humano recombinante de hasta 1 mg se produjo después de la transfección transitoria de células 293 HEK. El anticuerpo monoclonal humano recombinante de hasta 100 mg se produjo después de la transducción estable de células 293 HEK o las células NSO murinas usando vectores de lentivirus recombinantes.

*Producción a pequeña escala de anticuerpo humano recombinante por transfección transitoria*

**[0209]** El vector de cadena pesada de Ig y los vectores de cadena ligera de Ig se co-transfectaron en células HEK 293 usando el método estándar de co-precipitación con fosfato de calcio. Los anticuerpos recombinantes se purificaron del medio condicionado por células transfectadas HEK 293 usando purificación en columna con proteína A (GE-Healthcare, Otelfingen, Suiza).

*Producción a gran escala de anticuerpo humano recombinante por transducción estable*

**[0210]** Aquí, se empleó un sistema de transfección basado en lentivirus para generar líneas celulares transducidas de manera estable que producen anticuerpo humano recombinante (Zufferey *et al.*, J. Virol. 72 (1998), 9873-9880). Las células HEK 293 se co-transdujeron con dos lentivectores diferentes uno que porta un casete de expresión para la cadena pesada de Ig, el otro un casete para la cadena ligera de Ig de un anticuerpo recombinante. Este método de transducción puede usarse en un amplio rango de líneas celulares de mamífero tales como células CHO y NSO.

Validación en modelos de ratón transgénico de enfermedad humana

5 **[0211]** Se generaron ratones transgénicos como se ha descrito previamente (Knobloch *et al.*, Neurobiol. Aging 28 de julio (2006)) en un fondo híbrido de C57B1/6 y DBA2. El grupo de ensayo se retrocruzó una vez a C57B1/6. Los ratones se mantuvieron en condiciones de estabulación estándar en un ciclo reverso de 12h:12h de luz/oscuridad y tuvieron acceso libre a alimento y agua. Los grupos de tratamiento se equilibraron para edad (24 meses en el primer ensayo, 26 meses en el 2º ensayo) y sexo. Los ratones se trataron con anticuerpos (3 mg/kg de peso corporal) por inyecciones intraperitoneales una vez a la semana durante un periodo de tiempo de 2 meses resultando en 8 inyecciones por animal.

10 Ensayo de comportamiento en el laberinto en Y

15 **[0212]** La proporción de alternancia espontánea se evalúa usando un laberinto de plástico con forma de Y, con tamaños de brazo de 40 x 20 x 10 cm. Durante las sesiones de 5 min, se registran las secuencias de las entradas al brazo; la alternancia se definió como entradas sucesivas en los tres brazos, en conjuntos de tripletes superpuestos. El porcentaje de alternancia se calculó como la proporción de alternancias reales a posibles. Después de 2 meses de tratamiento con el anticuerpo, los ratones se reensayan en el laberinto en Y. Los experimentadores se mantienen siempre ciegos para ambos tratamientos y genotipos durante todo el experimento.

20 Penetración de la barrera hemato-encefálica y unión a estructuras anormales en el cerebro

25 **[0213]** Para evaluar si los anticuerpos seleccionados o fragmentos de los mismos pueden penetrar la barrera hemato-encefálica y unirse a sus dianas proteicas anormalmente agregadas o conformacionalmente alteradas en el cerebro, se administró una dosis eficaz del anticuerpo sistémicamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente o intranasalmente a un animal transgénico que se caracteriza por la acumulación no fisiológica de la diana proteica agregada o conformacionalmente alterada en el cerebro. La unión del anticuerpo a las estructuras patológicas específicas en el cerebro se evalúa por inmunotinción con un anticuerpo secundario anti-Ig humana marcado seguido de detección inmunohistoquímica estándar.

30 *Protocolo experimental:*

35 **[0214]** Los ratones del modelo transgénico PS-1/APP<sup>swe</sup> para la enfermedad de Alzheimer recibieron dos inyecciones periféricas de 150 µg de NI-101.11 en el día 1 y día 3. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la segunda inyección y se perfundieron con PBS. Los cerebros se congelaron y se prepararon cortes de tejido del tejido congelado usando un criotomo. La presencia de anticuerpo humano en las secciones de criostato se ensayó tiñendo con anticuerpo anti-IgG humana marcado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, Reino Unido). La localización de las placas amiloides se realizó co-tiñendo las secciones de criostato con el anticuerpo control específico de Abeta murino 6E10 (disponible en Covance, Número de Catálogo SIG-39320) seguido de anticuerpo anti IgG de ratón marcado con FITC. Alternativamente, sólo se usó la tinción con anticuerpo anti IgG humana marcado con Cy3. El análisis de fluorescencia se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica).

40 Reducción de la patología cerebral

45 **[0215]** Los efectos del tratamiento con anticuerpo en los niveles de dianas proteicas agregadas o conformacionalmente alteradas en el cerebro se evalúa por el tratamiento sistémico o administración cerebral dirigida del anticuerpo (intracraneal, intratecal o intraventricular) y un anticuerpo control no relacionado a animales transgénicos con acumulación no fisiológica característica de la diana proteica agregada o conformacionalmente alterada en el cerebro. Los efectos del tratamiento se evalúan por inmunotinción o tinción histoquímica de las dianas proteicas alteradas o agregadas y midiendo el área cubierta por dichos agregados, tamaño del agregado y número de agregados y cuantificación bioquímica de las concentraciones de las dianas proteicas en diferentes áreas cerebrales.

50 Ausencia de efectos secundarios relacionados con el tratamiento del anticuerpo

55 **[0216]** Los efectos adversos potenciales relacionados con la diana del tratamiento con anticuerpo se evaluarán por la administración sistémica o administración cerebral dirigida del anticuerpo (intracraneal, intratecal o intraventricular) y un anticuerpo control no relacionado a animales transgénicos con acumulación no fisiológica característica de la diana proteica agregada o conformacionalmente alterada en el cerebro. Los efectos secundarios potenciales se evaluarán por la inmunotinción o tinción histoquímica (por ejemplo, azul de Prusia para microhemorragias, hemotoxilina-eosina, células sanguíneas blancas activadas) y cuantificación bioquímica (por ejemplo, niveles de citoquinas por ELISA).

60 Tinción con inmunofluorescencia de células vivas

5 **[0217]** Las células HEK 293 se transfectaron de manera temporal con un vector que expresa APP humano de tipo salvaje fusionado en el extremo C terminal intracelular con la variante de proteína fluorescente amarilla Citrina. 24 horas después de la transfección, las células se incubaron con anticuerpos humanos recombinantes o anticuerpos control a 4°C durante 30 minutos. Después de una etapa de lavado, las células se fijaron y se detectó el anticuerpo unido a la superficie usando anticuerpos secundarios marcados con Cy3 frente a IgG humana o de ratón (Jackson ImmunoResearch). El análisis de la fluorescencia se realizó en un microscopio confocal (Leica).

Preparación de fibrillas de Abeta

10 **[0218]** El péptido Abeta se adquirió en Bachem (Bubendorf, Suiza). El péptido liofilizado se reconstituyó en TFA y se resuspendió en PBS inmediatamente antes de su uso como Abeta monomérico en los ensayos. Las fibrillas de Abeta se prepararon por incubación del péptido Abeta1-42 monomérico a una concentración de 100 µg/ml en PBS a 37°C durante 24 h. El péptido Abeta monomérico y las preparaciones de fibrillas también se usaron como sustrato para recubrir placas de ELISA.

15 Transferencia Western

20 **[0219]** El péptido Abeta monomérico se mezcló con colorante de carga, se desnaturalizó con calor y se cargaron 0,2 µg por carril y se separó en una SDS-PAGE en gradiente. Las transferencias se incubaron con anticuerpo primario durante 2 h. La unión del anticuerpo monoclonal humano primario o anticuerpo control de ratón 6E10 se reveló usando anticuerpos secundarios anti humano o anti ratón conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). Las transferencias se desarrollaron usando Sustrato de Máxima Sensibilidad SuperSignal West Femto (Pierce, Fisher Scientific, Wohlen, Suiza).

25 Competición para la unión a placas amiloides tisulares

30 **[0220]** El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 se incubó durante 2 h con preparaciones de péptido Abeta. Las preparaciones de anticuerpo/Abeta se usaron para la tinción inmunohistoquímica de sección de cerebro obtenida de un paciente con enfermedad de Alzheimer confirmada neuropatológicamente. Se prepararon crio-secciones de 5 µm, se bloquearon con 4% BSA, 5% suero de cabra y 5% suero de caballo en PBS durante 1 h a RT y se tiñeron con preparaciones NI-101.11/Abeta durante 1 h a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado, se analizó la unión de los anticuerpos humanos a las secciones tisulares usando anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 frente a IgG humana (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). El análisis de la fluorescencia se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica, Heerbrugg, Suiza).

35 Ejemplo 1

Detección de anticuerpos humanos frente a estructuras anormales predominantes en enfermedades cerebrales humanas

40 **[0221]** Se ensayaron anticuerpos de sujetos fenotípicamente sanos o pacientes excepcionalmente estables clínicamente con enfermedad de Alzheimer por inmunohistoquímica en secciones cerebrales obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente. La Figura 1A demuestra la presencia de anticuerpos en un paciente excepcionalmente estable clínicamente que se unen a placas beta-amiloides según se confirmó por co-tinción con un anticuerpo conocido frente a beta-amiloide humana (anticuerpo 4G8; Figura 1B). La presencia en un sujeto humano sano de anticuerpos frente a ovillos neurofibrilares en una sección de tejido obtenida de un paciente con enfermedad de Alzheimer se muestra en la Figura 2A. Este resultado se confirmó por co-tinción con un anticuerpo conocido frente a tau humano (HT7). La Figura 3A revela la presencia en un sujeto humano sano de anticuerpos frente a neuritas distróficas en una sección de tejido obtenida de un paciente con enfermedad de Alzheimer. La tinción control con un anticuerpo conocido frente a tau humano (HT7) se representa en la Figura 3B. Estos resultados demuestran la presencia en pacientes fenotípicamente sanos o excepcionalmente estables clínicamente de anticuerpos frente a estructuras patológicas identificables en muestras de tejido humano con diagnósticos confirmados histopatológicamente.

Ejemplo 2

55 Los anticuerpos humanos recombinantes mantienen la especificidad frente a estructura anormal *in vivo* y reconocen epítipo conformacional de proteína beta-amiloide asociada con enfermedad en placas amiloides cerebrales pero no el precursor fisiológico o derivado no patogénico de ésta

60 **[0222]** El anticuerpo NI-101.11 se obtuvo de pacientes con enfermedad de Alzheimer excepcionalmente estables clínicamente con una proporción significativamente reducida de decline cognitivo. El aislamiento de anticuerpos y la producción recombinante se realizó como se especifica en los métodos suplementarios.

NI-101.11

5 **[0223]** Se ensayó NI-101.11 recombinante para unión a placas beta-amiloides cerebrales (Figura 4). Se tiñeron secciones cerebrales obtenidas de un paciente con enfermedad de Alzheimer confirmada neuropatológicamente a las concentraciones indicadas. La unión del anticuerpo a placas beta-amiloides con concentraciones de 50 pM sugiere una unión de alta afinidad. La unión del anticuerpo NI-101.11 a placas beta-amiloides a una concentración de 0,5 nM no se ve afectada por competición por la adición de cantidades en exceso de polipéptido derivado de Abeta N-terminal lineal sintético que representa las posiciones 1 a 16 a concentraciones de hasta 1  $\mu$ M (Figura 5). Además, la unión de NI-101.11 a placas beta-amiloides en secciones cerebrales a concentración 8 nM se ve afectada por competición por cantidades en exceso de fibrillas de Abeta1-42 (4  $\mu$ M) pero no de monómeros de Abeta1-42 lineal sintético a concentración 4  $\mu$ M, lo que sugiere que NI-101.11 reconoce un epítipo conformacional que no está presente en Abeta monomérico (Figura 6).

15 **[0224]** Para evaluar adicionalmente la unión del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a Abeta monomérico lineal sintético, se separaron preparaciones de Abeta monomérico por PAGE no desnaturizante. La proteína transferida se ensayó con anticuerpo humano recombinante NI-101.11 y un anticuerpo control frente a secuencias Abeta N-terminal lineal (6E10). Mientras 6E10 produjo una tinción prominente del péptido Abeta monomérico, no se detectó ninguna unión para NI-101.11 lo que sugiere que NI-101.11 no se une al péptido Abeta monomérico lineal sino que reconoce un epítipo conformacional de Abeta (Figura 7).

25 **[0225]** La unión de NI-101.11 recombinante a fibrillas amiloides artificiales preparadas a partir de péptidos Abeta1-42 sintéticos y Abeta monomérico se determinó por ELISA (Figura 8). Las fibrillas de Abeta sintético o Abeta monomérico sintético utilizadas para recubrir placas ELISA a densidades de recubrimiento iguales se incubaron con NI-101.11 a las concentraciones indicadas. La unión a fibrillas amiloides artificiales (cuadrados abiertos) es más de 100 veces mayor comparado con Abeta monomérico (cuadrados llenos). El anticuerpo control 22C4 frente al C-terminal de Abeta se une preferentemente a Abeta monomérico (círculos llenos) y menos bien a las fibrillas (círculos abiertos). Esto sugiere que NI-101.11 reconoce un epítipo conformacional que también está presente en las fibrillas amiloides artificiales preparadas a partir de péptidos Abeta sintéticos.

30 **[0226]** La reactividad cruzada del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 frente a APP celular de longitud completa o con cualquiera de sus derivados fisiológicos se determinó por ensayos de unión celular (Figura 9).

35 **[0227]** Se incubaron células HEK 293 vivas que expresan de manera estable APP humana fusionada con Citrina como un marcador durante 30 min a 4<sup>0</sup>C, para evitar la internalización, con el anticuerpo humano recombinante NI-101.11 o el anticuerpo control 6E10 frente a la secuencia Abeta N-terminal lineal. Las señales positivas para citrina indican las células que expresan APP. A diferencia del anticuerpo control (6E10) que se une a APP de la superficie celular en todas las células que expresan la construcción de fusión, no se detecta ninguna unión de anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a APP de longitud completa. Estos datos demuestran la ausencia de reactividad cruzada de NI-101.11 con APP celular, fisiológica.

40 **[0228]** La ausencia de unión de NI-101.11 a Abeta monomérico se demostró adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño: No se observó ninguna unión de NI-101.11 o un anticuerpo control no relacionado a Abeta1-42 monomérico marcado con FITC (Figura 10A, 10B). Por el contrario, el anticuerpo 22C4 dirigido frente a un epítipo lineal presente en el C-terminal de Abeta co-eluyó con los monómeros Abeta1-42-FITC (Figura 10C).

45 **[0229]** En un ELISA de competición, la unión de 6E10, un anticuerpo dirigido frente a un epítipo lineal en el N-terminal de Abeta, podía bloquearse completamente después de una pre-incubación con concentraciones en exceso de péptidos monoméricos Abeta1-16, Abeta1-28 y Abeta1-40. Por el contrario, la pre-incubación con concentraciones en exceso de péptidos Abeta lineales no suprimió la unión de NI-101.11, lo que sugiere que NI-101.11 requiere un epítipo conformacional (Figura 11).

### Ejemplo 3

55 El anticuerpo humano recombinante frente a beta-amiloide cerebral cruza la barrera hemato encefálica en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer y se une a placas beta-amiloides cerebrales *in vivo*

60 **[0230]** Para determinar si el anticuerpo humano recombinante NI-101.11 cruza la barrera hemato encefálica y se une a placas beta-amiloides cerebrales *in vivo* los ratones del modelo de la enfermedad de Alzheimer PS-1/APPswe recibieron dos inyecciones periféricas de 150  $\mu$ g de NI-101.11 en el día 1 y día 3. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la segunda inyección y se perfundieron con PBS. Los cerebros se recogieron y se tiñeron secciones cerebrales con

anticuerpos marcados con FITC frente a IgG humana o con el anticuerpo Abeta monoclonal de ratón 6E10 seguido de un anticuerpo marcado con FITC frente a IgG de ratón para confirmar la presencia de placas beta-amiloides cerebrales. La tinción intensa de las placas amiloides con anti-IgG humana indicó que el anticuerpo humano recombinante NI-101.11 puede cruzar la barrera hemato-encefálica de ratones transgénicos y unirse a las placas beta-amiloides cerebrales en animales vivos (Figura 15).

#### Ejemplo 4

El anticuerpo humano recombinante frente a beta-amiloide mejora el comportamiento cognitivo anormal y confiere una reducción de la carga de placas beta-amiloides, astrogliosis y microgliosis en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer sin incrementar la frecuencia de microhemorragias

**[0231]** Se trataron ratones arcAbeta de 24 meses de edad y miembros de su camada de tipo salvaje con edad equivalente semanalmente i.p. con 3 mg/kg de anticuerpo humano recombinante NI-101.11 o un anticuerpo control humano con isotipo equivalente durante 2 meses. Para evaluar el efecto del tratamiento en el comportamiento anormal en los ratones transgénicos, se realizó un ensayo comportamental de laberinto en Y antes y después de la finalización del tratamiento. La proporción espontánea de alternancia se evaluó usando un laberinto de plástico con forma de Y, con tamaños de brazo de 40 x 20 x 10 cm. Durante las sesiones de 5 min, se registraron las secuencias de entradas en los brazos; la alternancia se definió como entradas sucesivas en los tres brazos, en conjuntos de tripletes superpuestos. El porcentaje de alternancia se calculó como la proporción de alternancias actuales a posibles (definida como el número total de entradas a brazos - 2) multiplicada por 100%. El rendimiento en el laberinto en Y de ratones arcAbeta no tratados y controles de miembros de su camada de tipo salvaje se comparó usando un ensayo de t no emparejado. El ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis se usó para comparar la mejora después del tratamiento en los 4 grupos. El ensayo no paramétrico de Mann-Whitney U se eligió para la comparación por pares de los diferentes grupos. Los participantes con cero (es decir, ratones que no dejaron el brazo en el que se pusieron) se excluyeron del análisis.

**[0232]** Como se observó en estudios previos, los ratones arcAbeta de 24 meses de edad no tratados estuvieron significativamente discapacitados comparados con sus compañeros de camada de tipo salvaje (Figura 16A, antes del tratamiento; ensayo t no emparejado,  $p=0,0007$ ).

**[0233]** Los ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 mostraron niveles de alteración claramente potenciados, comparables con los ratones control de tipo salvaje tratados con NI-101.11 después de 2 meses de tratamiento. El análisis de la mejora (es decir, rendimiento después del tratamiento menos rendimiento antes del tratamiento) mostró una diferencia significativa entre los cuatro grupos (Figura 16B, ensayo de Kruskal-Wallis;  $p=0,03$ ). Un análisis post-hoc por pares entre todos los grupos mostró que los ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 mejoraron su rendimiento cognitivo significativamente más que los ratones de tipo salvaje (Mann-Whitney U;  $p=0,05$  NI-101.11 tg frente a NI-101.11 wt;  $p=0,008$  NI-101.11 tg frente a control wt). Este grupo de ratones también mostró una tendencia fuerte hacia un rendimiento mejorado comparado con sus compañeros de camada transgénicos tratados con el anticuerpo control (Mann-Whitney-U;  $p=0,08$  NI-101.11 tg frente a control tg). Todos los ratones mostraron una mejora de ~10% en el rendimiento en el re-ensayo, lo que se debió probablemente al entorno familiar de la tarea.

**[0234]** Los efectos del tratamiento crónico de 2 meses con NI-101.11 en la carga amiloide, astrogliosis y microgliosis se analizaron por análisis histoquímico e inmunohistoquímico cuantitativos. Para este fin, los ratones se anestesiaron después de la finalización del ensayo comportamental y se perfundieron transcárdialmente con PBS. Un hemisferio cerebral se fijó en 4% paraformaldehído y se incluyó en parafina. Se cortaron secciones sagitales de 5  $\mu\text{m}$  con un microtomo Leica RM 2135 (Bannockburn, Illinois). La carga de placas beta-amiloides en la corteza y el hipocampo se cuantificó en secciones de cerebro teñidas con Tioflavina S y Rojo Congo según el protocolo estándar. Para la inmunohistoquímica, los cortes se desparafinaron, se bloquearon con 4% BSA, 5% suero de cabra y 5% suero de caballo en PBS durante 1 h a RT. Los anticuerpos se incubaron toda la noche a 4°C usando las diluciones siguientes: anti-GFAP (Advanced Immunochemicals) 1:500, anti-IBA1 (WAKO) 1:500. Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo se incubaron a RT durante 2 h. Se usaron 2-3 secciones por cerebro de ratón espaciadas 75  $\mu\text{m}$  entre sí para cada tinción. Se tomaron 2 imágenes por sección a un aumento de 10x para el análisis de la corteza (región parietal y frontal). El área completa del hipocampo (aumento de 5x ajustado a la ROI) se tomó para el análisis del hipocampo. El análisis de imágenes automático se hizo con el software ImageJ.

**[0235]** La tinción doble de las secciones cerebrales de ratones arcAbeta inmunizados con 6E10 y anti-IgG humana revelaron la unión de NI-101.11 a depósitos Abeta (Figura 17, panel izquierdo), lo que indica que NI-101.11 puede cruzar la barrera hemato encefálica y unirse a placas beta-amiloides cerebrales. No se observó esta unión del anticuerpo humano a depósitos Abeta en los ratones arcAbeta tratados con anticuerpo control (Figura 17, panel derecho).

**[0236]** [0317] El tratamiento crónico con 3 mg/kg de NI-101.11 resultó en una reducción significativa de la carga de placas amiloides como se reveló por la tinción con Tioflavina S y Rojo Congo. Esta reducción alcanzó niveles de más del 50% en la corteza e hipocampo comparado con los ratones arcAbeta tratados con anticuerpo control (Figura 18A, B). Además del área de la placa (Figura 18C), también se observaron reducciones significativas para el número de placas (Figura 18D) y el tamaño medio de las placas (Figura 18E).

**[0237]** Para ensayar si el tratamiento crónico con NI-101.11 afecta la respuesta neuroinflamatoria en los ratones arcAbeta, se cuantificaron los astrocitos reactivos y microglia después de la tinción inmunohistológica. Se observó una reducción en el número de astrocitos reactivos (tinción anti-GFAP) en la corteza de los ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 comparado con los animales tratados con el anticuerpo control (Figura 19A; Mann-Whitney-U; p= 0,047). No se detectó ningún cambio en el hipocampo. La tinción con un anticuerpo frente a un marcador de microglia y macrófagos (anti-Iba1) también reveló una tendencia estadística hacia inflamación reducida (Figura 19B; Mann-Whitney-U; p= 0,075 tanto para corteza como hipocampo). La disminución en la astrocitosis y microgliosis está en línea con la carga beta-amiloide reducida observada después del tratamiento con NI-101.11.

**[0238]** La inmunoterapia pasiva con determinados anticuerpos monoclonales dirigidos frente a Abeta puede asociarse con una frecuencia incrementada de microhemorragias en el cerebro (Pfeifer et al., Science 298 (2002), 1379; Wilcock et al., J Neuroinflammation 1 (2004), 24). Para evaluar los efectos de la terapia crónica con NI-101.11, se realizó una tinción con azul de Prusia de Perl en secciones cerebrales de ratones arcAbeta y de tipo salvaje después de tratamiento crónico con NI-101.11. Esta tinción revela la presencia de hemosiderina, un producto de degradación de la hemoglobina, y marcador de microhemorragias previas (Figura 20). En los ratones arcAbeta viejos tratados con un anticuerpo control, la frecuencia de perfiles positivos para azul de Prusia estaba significativamente elevada comparado con su compañeros de camada de tipo salvaje (Mann-Whitney-U; p= 0,001). El tratamiento con NI-101.11 no dio lugar a un incremento en el número de microhemorragias cuando se compara con los ratones arcAbeta tratados con anticuerpo control (Mann-Whitney-U; p= 0,347) lo que indica que los efectos terapéuticos beneficiosos del tratamiento con NI-101.11 ocurrieron en ausencia de este efecto secundario observado frecuentemente de inmunoterapia pasiva de Abeta.

Ejemplo 5

El anticuerpo humano recombinante frente a beta-amiloide cerebral inhibe la formación de fibrillas de Abeta sintéticas *in vitro*

**[0239]** Se ensayó el efecto del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 en la formación de fibrillas Abeta midiendo la Tioflavina S unida a Abeta agregado por análisis de fluorescencia. Se incubaron disoluciones de Abeta monomérico a 37°C durante 24 h en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de NI-101.11. La formación de fibrillas de Abeta sintéticas *in vitro* se inhibió por NI-101.11 humano recombinante de una manera dependiente de la concentración (Figura 21).

Ejemplo 6

Efectos de NI-101.11 en la fagocitosis ex vivo de fibrillas de Abeta por células derivadas de microglia BV-2

**[0240]** Se estudiaron los efectos de NI-101.11 en la fagocitosis mediada por el receptor Fcgamma de fibrillas de Abeta en la línea celular derivada de microglia BV-2. Las células BV-2 se mantuvieron en DMEM suplementado con 5% FBS, Pen/Estrep y glutamina. Las células se tripsinizaron y se sembraron 120.000 células BV-2/pocillo en placas de 24 pocillos con el fondo plano. Después de 12 h, el medio se reemplazó por 400 µl de DMEM/F12/pocillo suplementado con 20 mM HEPES (pH 7,3), 1% BSA, 10 µg/ml Pen/Estrep. Se añadieron 100 µg/ml de Fucoïdan, un inhibidor del receptor barredor ("scavenger") 30 min antes del experimento. Se pre-incubaron fibrillas de Abeta marcadas con FITC 50 µM con las concentraciones indicadas de anticuerpos durante 30 min a 37°C, se lavó dos veces seguido de centrifugación durante 5 min a 14.000 x g. Esta suspensión se añadió a las placas de cultivo tisular. Después de 30 min, las células BV-2 se lavaron dos veces con HBSS para eliminar Abeta fibrilar no asociado.

**[0241]** Las células se trataron con 250 µg/ml tripsina/EDTA durante 20 min a 4°C y se lavaron dos veces por centrifugación a 500 x g durante 5 min a 4°C. Las células se fijaron durante 20 min en FACS-Fix (PBS, 2% FA, 2% Glucosa, 5 mM NaN) y se lavaron dos veces con lavado FACS (PBS, 5 µM EDTA, 0,2% BSA). La fluorescencia (FL-1) de 10.000 células se determinó por análisis FACS (basado en Webster SD et al., JI 2001).

**[0242]** La fagocitosis dependiente del receptor Fcgamma de fibrillas de Abeta1-42 marcadas con FITC se midió después de la inhibición del sistema de receptor barredor ("scavenger"). El análisis comparativo de NI-101.11 humano y un anticuerpo disponible comercialmente dirigido a un epítipo lineal en el N-terminal del péptido Abeta (6E10) demostró una inducción dependiente de la dosis de la fagocitosis de fibrillas de Abeta. La captación de las fibrillas mediada por NI-

101.11 es hasta 3 veces mayor que la observada para el anticuerpo 6E10 (Figura 22). Estos datos indican que NI-101.11 desencadena una fagocitosis mediada por el receptor Fcγ3 potente dependiente de la dosis de fibrillas de Abeta por las células microgliales.

5 Conclusión

[0243] Como se ha demostrado en los experimentos anteriores realizados según la presente invención, fue sorprendentemente posible detectar anticuerpos protectores y terapéuticamente activos y células B productoras de anticuerpos en sujetos humanos asintomáticos, fenotípicamente sanos, así como en pacientes con cursos de la enfermedad excepcionalmente estables clínicamente a pesar de un diagnóstico de discapacidad cognitiva o enfermedad de Alzheimer. Más específicamente, pudo detectarse y aislarse una nueva clase de anticuerpos humanos, que discriminan la forma fisiológicamente funcional de un antígeno, minimizando de esta manera el riesgo de efectos secundarios autoinmunogénicos que era hasta ahora un problema en la inmunoterapia. Así, se proporcionan anticuerpos y moléculas de unión equivalentes que reconocen específicamente una variante del antígeno en una estructura patofisiológicamente relevante, a la que se supone que el anticuerpo se une con el fin de disminuir su toxicidad o para reducir su concentración o para estimular su degradación, por ejemplo, haciendo que el patógeno sea visible para los macrófagos que expresan FcR o células microgliales y, por lo tanto, volverlo inocuo. Como se ha demostrado adicionalmente en los ejemplos, dichos anticuerpos son terapéuticamente eficaces y son capaces tanto de suspender como de prevenir los efectos perjudiciales de proteínas patológicas anormales y agregados de éstas sin incrementar la frecuencia de microhemorragias cerebrales.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0244]

25 <110> Universidad de Zurich  
 <120> Método para proporcionar moléculas de unión y dianas específicas de enfermedad  
 <130> NE30A06/P-WO  
 <160> 56  
 30 <170> PatentIn versión 3.4  
 <210> 1  
 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 35 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (66)  
 <223> Péptido líder derivado de Vκappa I L5 humano, sitio de restricción Xba 1 introducido en 3' de la secuencia  
 <220>  
 40 <221> CDS  
 <222> (1) .. (66)  
 <400> 1  
 atg gac atg cgg gtg ccc gcc cag ctg ctg ggc ctg ctg ctg ctg tgg 48  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
  
 ttc ccc ggc tct aga tgc 66  
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys  
 20  
 45 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
  
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys  
 20

ES 2 439 490 T3

```

<210> 3
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens
5 <220>
  <221> región_V
  <222> (1) .. (372)
  <223> NI-101.10-secuencia de la cadena pesada variable (Vh)
  <220>
10 <221> CDS
   <222> (1) .. (372)
   <400> 3
   gag gtg cag cta gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg      48
   Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
   1                               5                               10                               15

   tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat      96
   Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
   20                               25                               30

   ggc ata cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg      144
   Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
   35                               40                               45

   gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg      192
   Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
   50                               55                               60

   aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat      240
   Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
   65                               70                               75                               80

   ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
   Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85                               90                               95

   gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac      336
   Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
   100                               105                               110

   gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca      372
   Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
   115                               120

<210> 4
15 <211> 124
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <400> 4

```

ES 2 439 490 T3

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

- <210> 5
- <211> 372
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Con codones optimizados
- <220>
- 10 <221> región\_V
- <222> (1) .. (372)
- <223> NI-101.11-secuencia de la cadena pesada variable (Vh)
- <220>
- <221> CDS
- 15 <222> (1) .. (372)
- <400> 5

ES 2 439 490 T3

```

gag gtg cag ctg gtg cag agc ggc ggc ggc gtg gtg cag ccc ggc cgg      48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

agc ctg cgg ctg agc tgc gcc gcc agc ggc ttc gcc ttc agc agc tac      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

ggc atg cac tgg gtg cgg cag gcc ccc ggc aag ggc ctg gag tgg gtg      144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

gcc gtg atc tgg ttc gac ggc acc aag aag tac tac acc gac agc gtg      192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
          50          55          60

aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac agc aag aac acc ctg tac      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

ctg cag atg aac acc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc      288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

gcc cgg gac cgg ggc atc ggc gcc cgg cgg ggc ccc tac tac atg gac      336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
          100          105          110

gtg tgg ggc aag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc      372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 6

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

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

```

ES 2 439 490 T3

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 7

<211> 327

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> región\_V

<222> (1) .. (327)

<223> NI-101.10 y NI-101.11-secuencia de la cadena ligera kappa variable (Vkappa)

10 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (327)

<400> 7

ES 2 439 490 T3

gaa att gtg ctg act cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc 288  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu  
 85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag ctc gag atc aaa cgt acg 327  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 100 105

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Ile Val Leu 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 Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Asn 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 100 105

```

<210> 9
<211> 381
<212> ADN
<213> Homo sapiens
5 <220>
  <221> región_V
  <222> (1) .. (381)
  <223> NI-101.12-secuencia de la cadena pesada variable (Vh)
10 <220>
  <221> CDS
  <222> (1) .. (381)
  <400> 9
  gag gtg cag ctg gtg gag agc ggc ccc ggc ctg gtg aag ccc gcc gag      48
  Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
  1                               5                               10                               15

  acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg agc ggc ggc agc atc cgg agc ggc      96
  Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
  20                               25                               30

  agc atc tgc tgg tac tgg atc cgg cag ccc ccc ggc aag ggc ctg gag      144
  Ser Ile Cys Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
  35                               40                               45

  tgg atc ggc tac ttc tgc tac agc ggc gcc acc ttc tac acc ccc agc      192
  Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
  50                               55                               60

  ctg cgg ggc cgg ctg acc atc agc gtg gac gcc agc aag aac cag ctg      240
  Leu Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Leu
  65                               70                               75                               80

  agc ctg agc ctg agc agc gtg acc gcc gcc gac acc gcc gtg tac tac      288
  Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
  85                               90                               95

  tgc gcc cgg cgg gcc ggc gag aac agc ggc ggc atc gag ccc tac tac      336
  Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr
  100                              105                              110

  ggc atg gac gtg tgg ggc cag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc      381
  Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
  115                              120                              125
15 <210> 10
  <211> 127
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens
  <400> 10

```

ES 2 439 490 T3

```

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

```

<210> 11

<211> 330

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> región\_V

<222> (1) .. (330)

<223> NI-101.12-secuencia de la cadena ligera kappa variable (Vkappa)

10 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (330)

<400> 11

ES 2 439 490 T3

```

gac gag atc gtg ctg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc atc      48
Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile
1          5          10          15

ggc gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gcc agc gag agc atc aac aag      96
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys
          20          25          30

tac gtg aac tgg tac cag cag aag ccc gcc aag gcc ccc aag ctg ctg      144
Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
          35          40          45

atc tac gcc gcc agc agc ctg cag agc gcc gcc ccc agc cgg gtg agc      192
Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser
          50          55          60

ggc agc gcc ttc gcc cgg gac ttc agc ctg acc atc agc gcc ctg cag      240
Gly Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65          70          75          80

gcc gag gac ttc gcc gcc tac ttc tgc cag cag agc tac agc gcc ccc      288
Ala Glu Asp Phe Gly Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro
          85          90          95

tac acc ttc gcc cag gcc acc aag gtg gag atc aag cgg acc      330
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
          100          105          110

```

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 439 490 T3

```

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

```

```

<210> 13
<211> 363
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<220>
<221> región_V
<222> (1) .. (363)
<223> NI-101.13-secuencia de la cadena pesada variable (Vh)
10 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (363)
<400> 13

```

ES 2 439 490 T3

cag gta cag ctg cag gag tca ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc aga aga 96  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg  
 20 25 30

agt tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag tcc cca ggg aag ggg ctg gag 144  
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

tgg agt gga agt atc cat tat agc ggg agc acc tac tac aac ccg tcc 192  
 Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

ctc aag agt cga gtc acc ata tct gta gac acg tcc aag aac cag ttc 240  
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

tcc ctg aaa ctg agc tct gtt acc gcc gca gac acg gct gtc tat tac 288  
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

tgt gcg aga tca cgt tgg ggc agc agc tgg gta ttt gac tac tgg ggc 336  
 Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

cag ggc aca ctg gtc acc gtc tct tcg 363  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 14  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14

5

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 15

<211> 330

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> región\_V

<222> (1) .. (330)

10 <223> NI-101.13-secuencia de la cadena ligera lambda variable (Vlambda)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (330)

<400> 15

cag agc gtg ctg acc cag ccg ccg agc gcg agc ggc acc ccg ggc cag 48  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

cgc gtg acc att agc tgc agc ggc agc agc agc aac att ggc agc aac 96  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
20 25 30

tat gtg tat tgg tat cag cag ccg ccg ggc acc gcg ccg aaa ctg ctg 144  
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

att tat cgc aac aac cag cgc ccg agc ggc gtg ccg gat cgc ttt agc 192  
Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

ggc agc aaa agc ggc acc agc gcg agc ctg gcg att agc ggc ctg cgc 240  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
65 70 75 80

agc gaa gat gaa gcg gat tat tat tgc gcg gcg tgg gat gat agc ctg 288  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

agc ggc tat gtg ttt ggc acc ggc acc aaa gtg acc gtg ctg 330  
Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105 110

15 <210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 439 490 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr 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 Tyr Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (1) .. (5)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR1

<400> 17

Ser Tyr Gly Ile His

1 5

<210> 18

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1) .. (17)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR2

<400> 18

Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys

25 1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (15)  
 5 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR3  
 <400> 19  
**Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val**  
**1 5 10 15**

<210> 20  
 <211> 5  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 15 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (5)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh,  
 CDR1  
 <400> 20  
**Ser Tyr Gly Met His**  
**1 5**

<210> 21  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (17)  
 30 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh,  
 CDR2  
 <400> 21  
**Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**  
 <210> 22  
 35 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 40 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (15)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh,  
 CDR3  
 <400> 22  
**Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val**  
**1 5 10 15**

<210> 23  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (11)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A V kappa, CDR1  
 5 <400> 23  
**Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn**  
**1 5 10**  
 <210> 24  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 15 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (7)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A V kappa, CDR2  
 <400> 24  
**Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser**  
 20 **1 5**  
 <210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (9)  
 30 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A V kappa, CDR3  
 <400> 25  
**Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr**  
**1 5**  
 <210> 26  
 35 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 40 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (5)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR1  
 <400> 26  
**Ser Gly Ser Ile Cys**  
 45 **1 5**  
 <210> 27  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (19)  
 55 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR2  
 <400> 27

**Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser**  
**1 5 10 15**  
**Leu Arg Gly**  
 <210> 28  
 <211> 17  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 10 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (17)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR3  
 <400> 28  
**Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr Gly Met Asp**  
**1 5 10 15**  
 15 **Val**  
 <210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (11)  
 25 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR1  
 <400> 29  
**Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys Tyr Val Asn**  
**1 5 10**  
 <210> 30  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 35 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (7)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR2  
 <400> 30  
**Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser**  
**1 5**  
 40 <210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR3  
 50 <400> 31  
**Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Tyr Thr**  
**1 5**  
 <210> 32  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 5 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (7)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR1  
 <400> 32  
**Arg Arg Ser Tyr Tyr Trp Gly**  
**1 5**

10 <210> 33  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (16)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR2  
 <400> 33  
**Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser**  
**1 5 10 15**

20 <210> 34  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 30 <222> (1) .. (11)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR3  
 <400> 34  
**Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr**  
**1 5 10**

35 <210> 35  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 40 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (13)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR1  
 <400> 35  
**Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr**  
**1 5 10**

45 <210> 36  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (7)  
 55 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR2  
 <400> 36

```

    Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
    1           5
<210> 37
<211> 11
<212> PRT
5 <213> Artificial
<220>
<223> región determinante de la complementariedad (CDR)
<220>
10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1) .. (11)
<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR3
<400> 37
    Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val
    1           5           10
15 <210> 38
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
20 <221> región_V
>222> (1) .. (372)
<223> NI-101-12F6A-secuencia de la cadena pesada variable (Vh)
<220>
25 <221> CDS
<222> (1) .. (372)
<400> 38
    cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg      48
    Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
    1           5           10           15
    tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat      96
    Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
    20           25           30
    ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg      144
    Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    35           40           45
    gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg      192
    Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50           55           60
    aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat      240
    Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65           70           75           80
    ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
    Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    85           90           95
    gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac      336
    Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
    100           105           110
    gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca      372
    Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    115           120
<210> 39

```

ES 2 439 490 T3

<211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 39

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 Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60

5

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 40  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> región\_V  
 >222> (1) .. (324)  
 <223> NI-101-12F6A-secuencia de la cadena ligera kappa variable (Vkappa)  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (324)  
 <400> 40

10

15

ES 2 439 490 T3

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20          25          30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
          85          90          95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt      324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105

```

<210> 41  
<211> 108  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens  
<400> 41

```

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 Ser Ile Ser Ser Tyr
          20          25          30

Leu Asn 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
          85          90          95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105

```

ES 2 439 490 T3

<210> 42  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5 <220>  
 <221> región\_V  
 >222> (1) .. (121)  
 <223> NI-101.13A-secuencia de la cadena pesada variable (Vh)  
 <400> 42  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg  
 20 25 30  
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 10 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 43  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> región\_V  
 >222> (1) .. (121)  
 <223> NI-101.13B-secuencia de la cadena pesada variable (Vh)  
 20 <400> 43

ES 2 439 490 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> región\_V

>222> (1) .. (107)

<223> NI-101.13A-secuencia de la cadena ligera variable (VI)

10 <400> 44

Asp Ile Gln Leu 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 Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

ES 2 439 490 T3

Leu Asn 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 Ser Tyr Ser Thr Arg Thr  
 85 90 95

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

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> región\_V

>222> (1) .. (108)

<223> NI-101.13B-secuencia de la cadena ligera variable (VI)

10 <400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 5 <222> (1) .. (11)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13A-secuencia de la cadena ligera variable (VL), CDR1  
 <400> 46  
**Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn**  
**1 5 10**

10 <210> 47  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>

15 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (7)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13A-secuencia de la cadena ligera variable (VI), CDR2  
 20 <400> 47  
**Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser**  
**1 5**

<210> 48  
 <211> 8  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>

30 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (8)  
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13A-secuencia de la cadena ligera variable (VI), CDR3  
 <400> 48  
**Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Arg Thr**  
 35 **1 5**

<210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1) .. (11)  
 45 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13B-secuencia de la cadena ligera variable (VI), CDR1  
 <400> 49  
**Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala**  
**1 5 10**

<210> 50  
 <211> 7  
 50 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)  
 <220>

55 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC



```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agaagaagtt actactgggg ctggatccgc      120
cagtccccag ggaaggggct ggagtggagt ggaagtatcc attatagecg gagcacctac      180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagtcacc atatctgtag acacgtccaa gaaccagttc      240
tcctgaaac tgagctctgt taccgccgca gacacggctg tctattactg tgcgagatca      300
cgttggggca gcagctgggt atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc      360
tcg                                                                              363
<210> 54
<211> 324
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<220>
<221> región_V
>222> (1) .. (324)
<223> NI-101.13A-secuencia de la cadena ligera variable (VI)
10 <400> 54
gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatget gcatecagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagatthttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccagaacggt cggccaaggg      300
accaagggtg agatcaaacg tacg                                                                              324
<210> 55
<211> 327
<212> ADN
15 <213> Homo sapiens
<220>
<221> región_V
>222> (1) .. (327)
<223> NI-101.13B-secuencia de la cadena ligera variable (VI)
20 <400> 55
gacatccagt tgaccagtc tcttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggccagtea gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagattcca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gatgatthttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctcgaac gttcggccaa      300
gggaccaagc tggagatcaa acgtacg                                                                              327
<210> 56
<211> 372
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens
<220>
<221> región_V

```

ES 2 439 490 T3

>222> (1) .. (372)

<223> NI-101.11-secuencia de la cadena pesada variable (Vh)

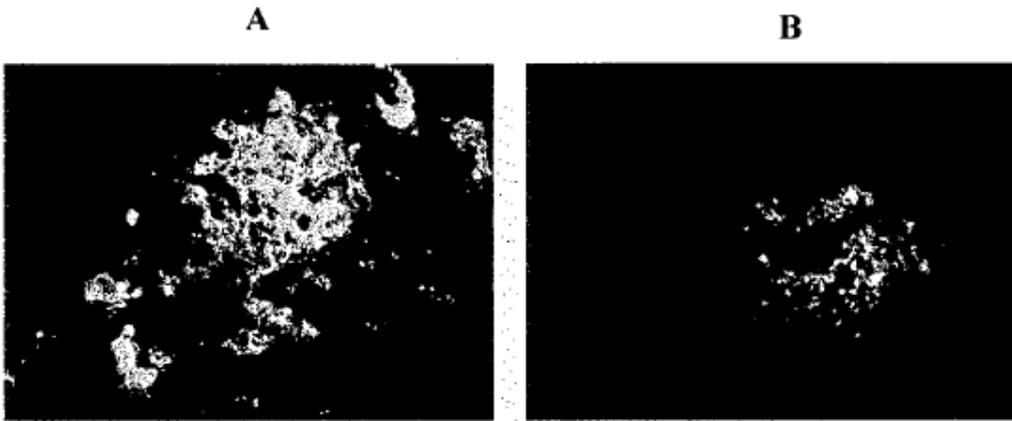
<400> 56

```
gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tccctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtttg atggaactaa aaaatactat      180
acagactccg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat      240
ctgcaaatga acaccctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagg      300
ggtataggag ctcgccgggg gccgtactac atggacgtct ggggcaaagg gaccacggtc      360
accgtctect ca                                                                372
```

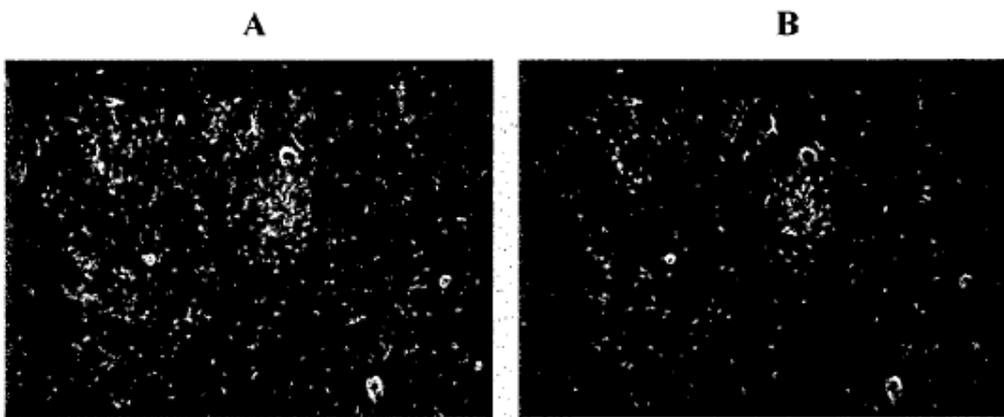
5

**REIVINDICACIONES**

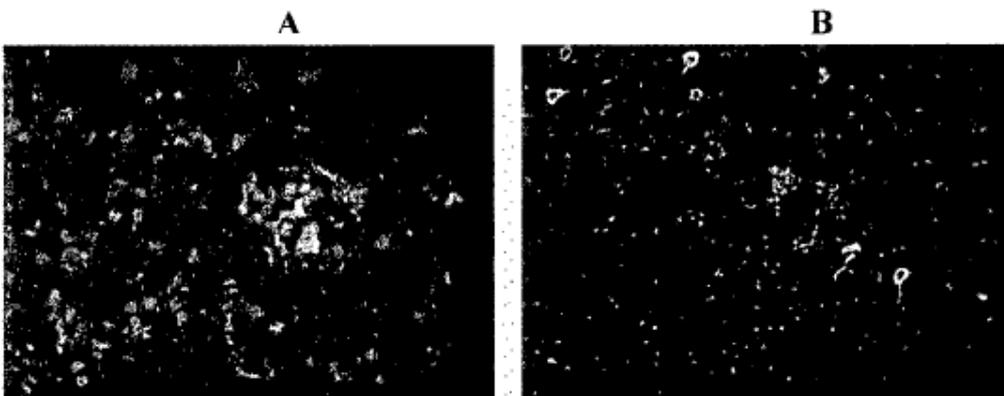
- 5 **1.** Anticuerpo anti-beta amiloide humano aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en el que la VH comprende una primera región determinante de la complementariedad (VHCDR1) con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, una VHCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y una VHCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 y en el que la VL comprende una VLCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23, una VLCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24 y una VLCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25.
- 10 **2.** Anticuerpo o fragmento del mismo, según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de VH y VL tal como se representa en SEQ ID NO. 6 y SEQ ID NO: 8.
- 15 **3.** Anticuerpo o fragmento del mismo, según la reivindicación 1 ó 2, que se selecciona del grupo que consiste en un fragmento de cadena única Fv (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')<sub>2</sub>.
- 4.** Polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 **5.** Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 4.
- 6.** Célula huésped que comprende el polinucleótido según la reivindicación 4 o el vector según la reivindicación 5.
- 25 **7.** Método para preparar un anticuerpo específico de beta-amiloide o fragmento del mismo, comprendiendo dicho método  
(a) cultivar la célula según la reivindicación 6; y  
(b) aislar dicho anticuerpo o fragmento del mismo del cultivo.
- 30 **8.** Anticuerpo o fragmento del mismo codificado por el polinucleótido según la reivindicación 4 o que se puede obtener por el método según la reivindicación 7.
- 35 **9.** Anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 u 8, que  
(a) se marca de forma detectable, preferiblemente en el que el marcaje detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado; o  
(b) se une a un fármaco.
- 40 **10.** Composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 ó 9, el polinucleótido según la reivindicación 4, el vector según la reivindicación 5 o la célula huésped según la reivindicación 6, preferiblemente en la que  
(a) la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente que comprende además un agente adicional útil para tratar la enfermedad de Alzheimer, seleccionado del grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-Abeta y combinaciones de los mismos; o  
(b) la composición es una composición o kit de diagnóstico y comprende además reactivos usados convencionalmente en métodos de diagnóstico basados en el sistema inmune o ácido nucleico.
- 45 **11.** Composición, según la reivindicación 10, que es una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 50 **12.** Composición, según la reivindicación 10 o la composición según la reivindicación 11 para uso según la reivindicación 11, que se diseña para ser administrada intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intranasalmente, parenteralmente o como un aerosol.
- 13.** Composición, según la reivindicación 10 para el diagnóstico o cribado de un sujeto para la presencia de la enfermedad de Alzheimer o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

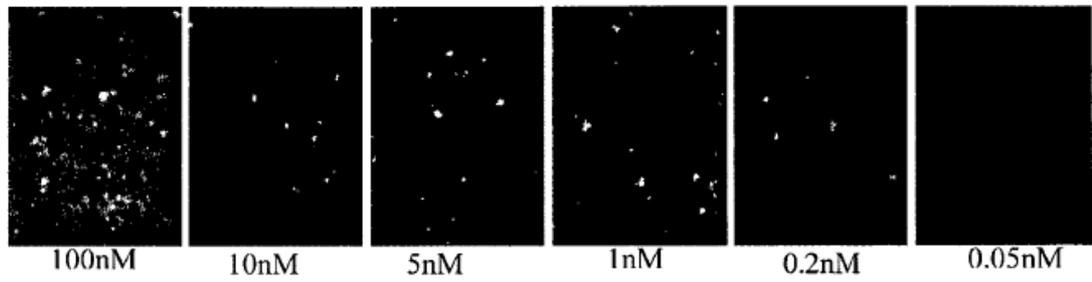


FIG. 4

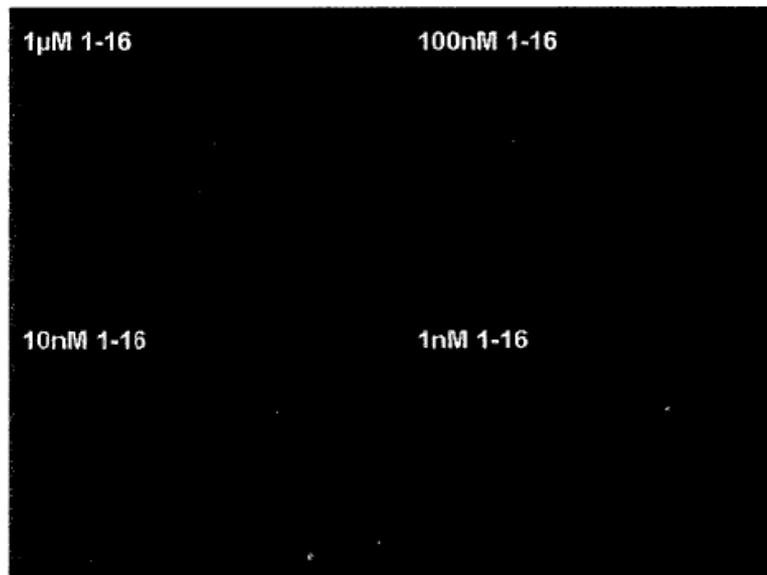


FIG. 5

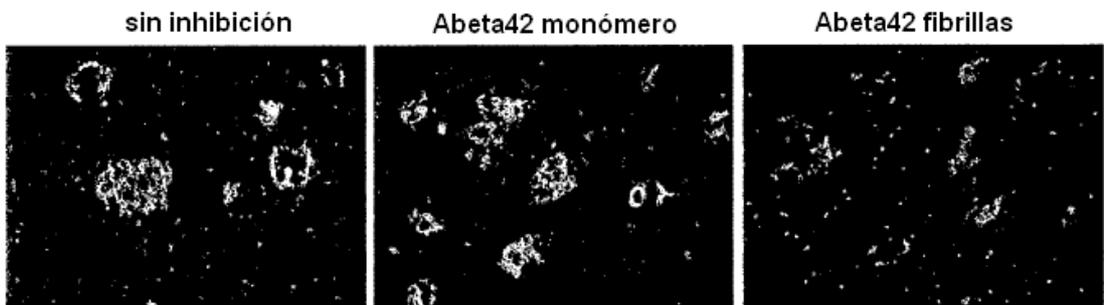


FIG. 6

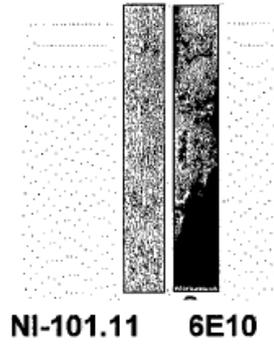


FIG. 7

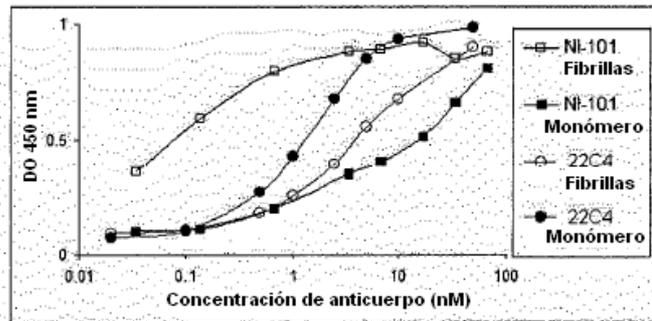


FIG. 8

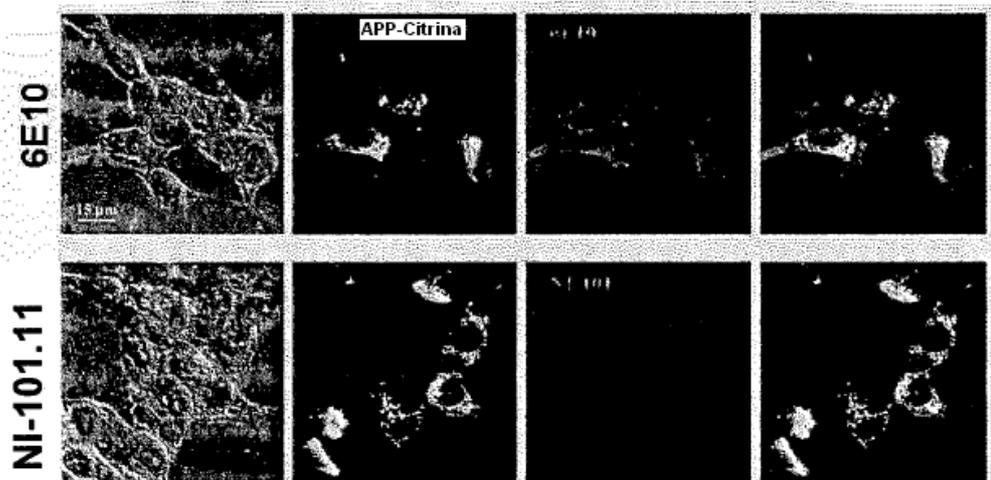


FIG. 9

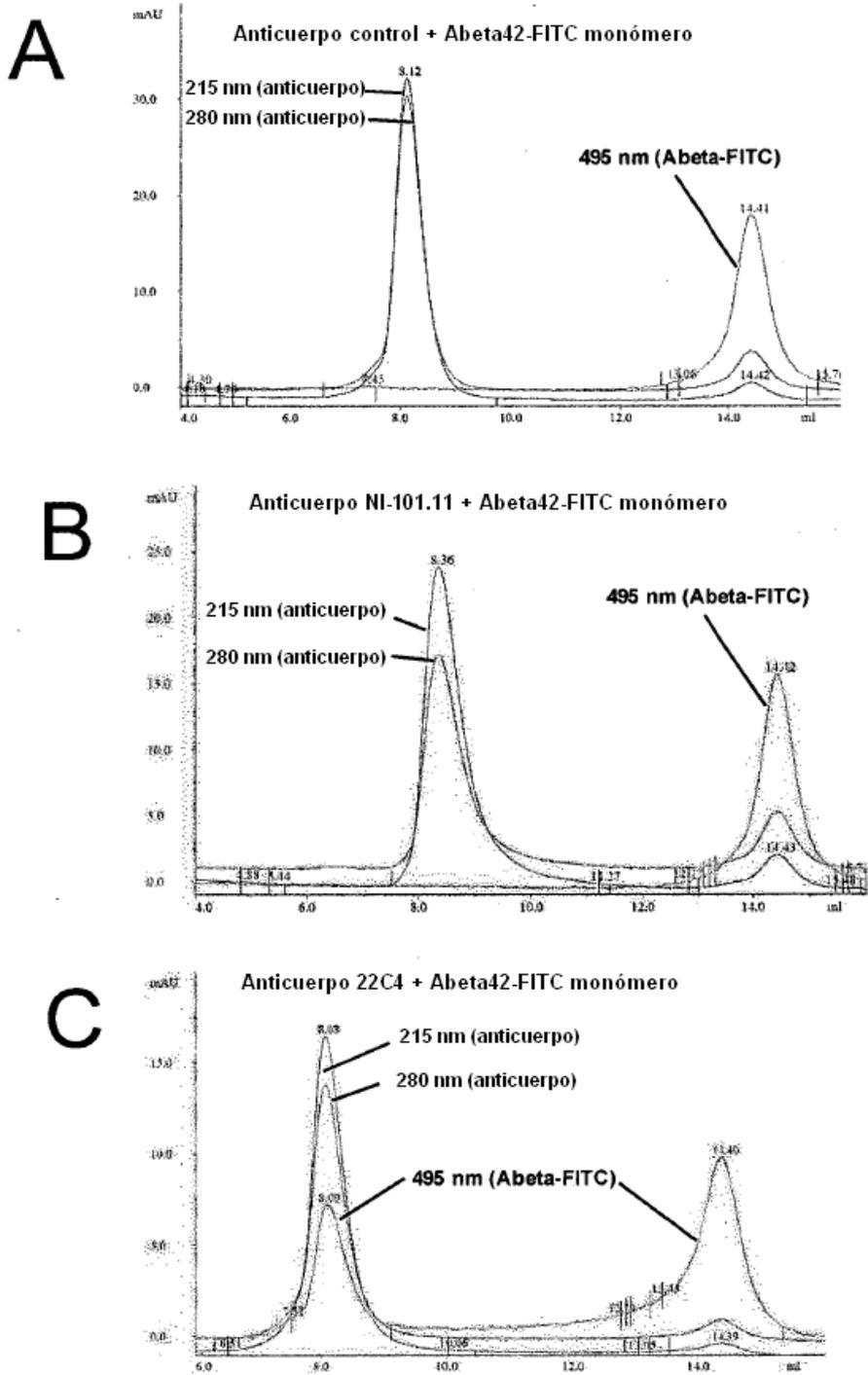


FIG. 10A-C

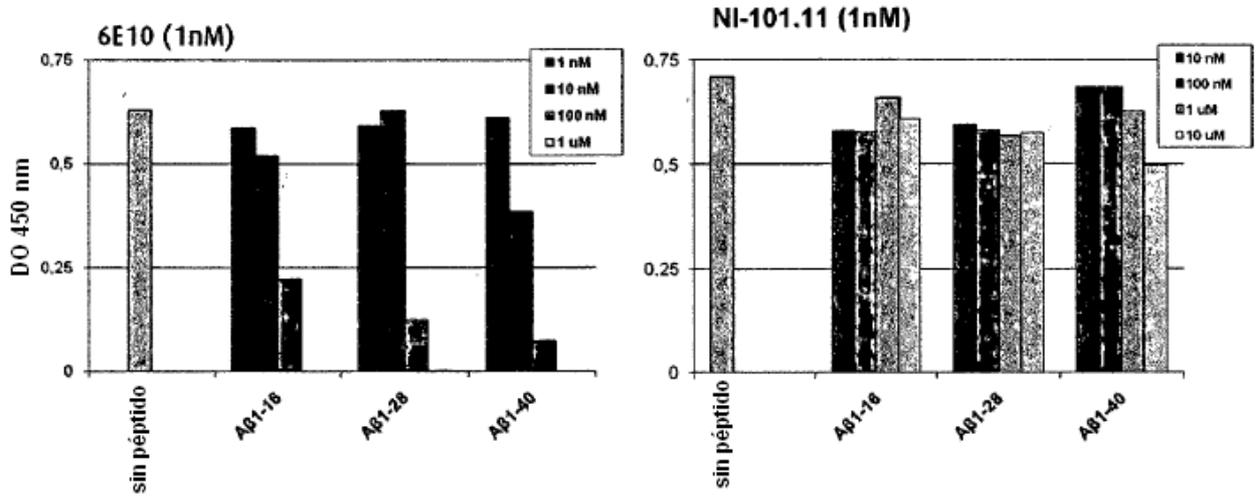
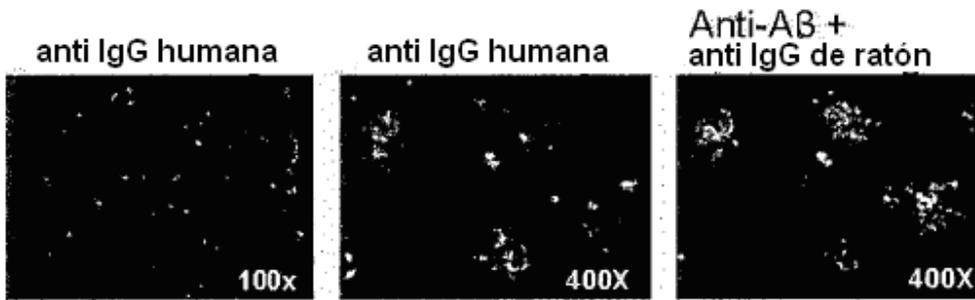
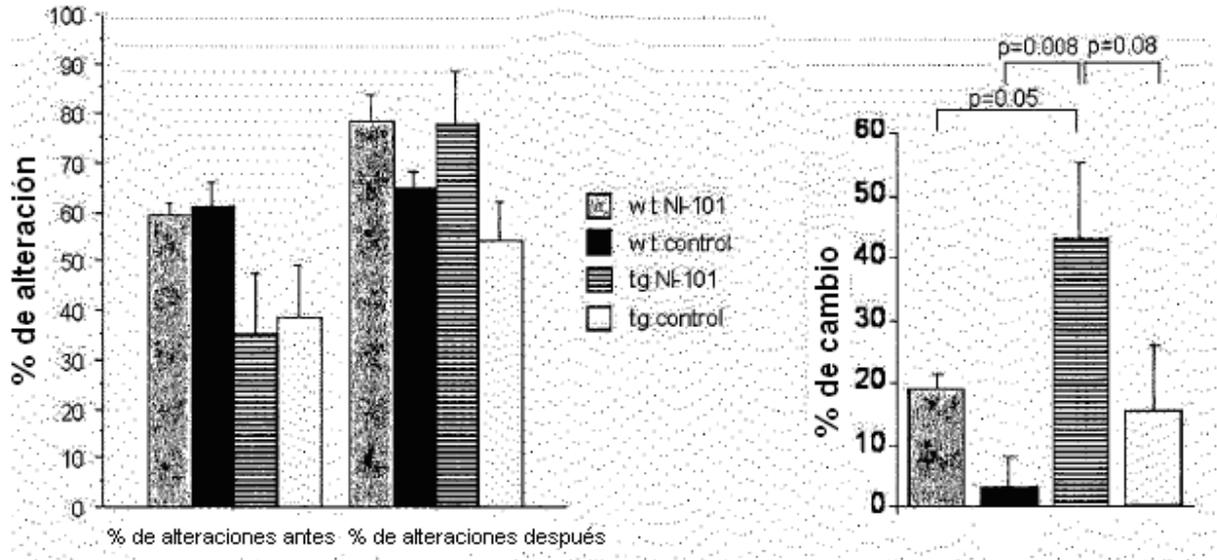


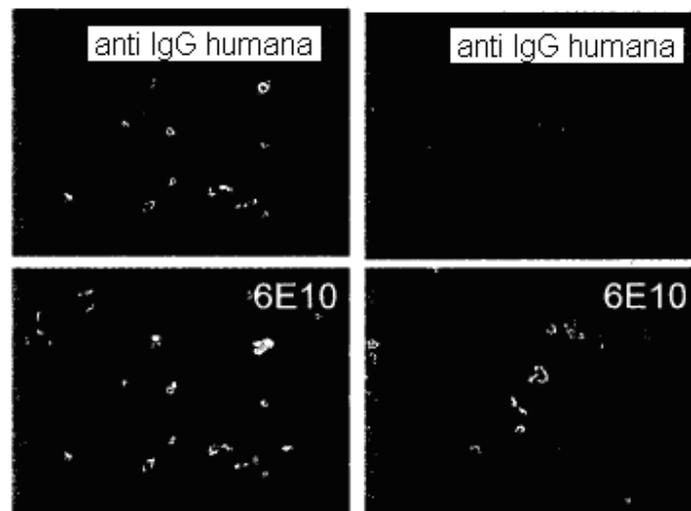
FIG. 11



**FIG. 15**



**FIG. 16A-B**



**FIG. 17**

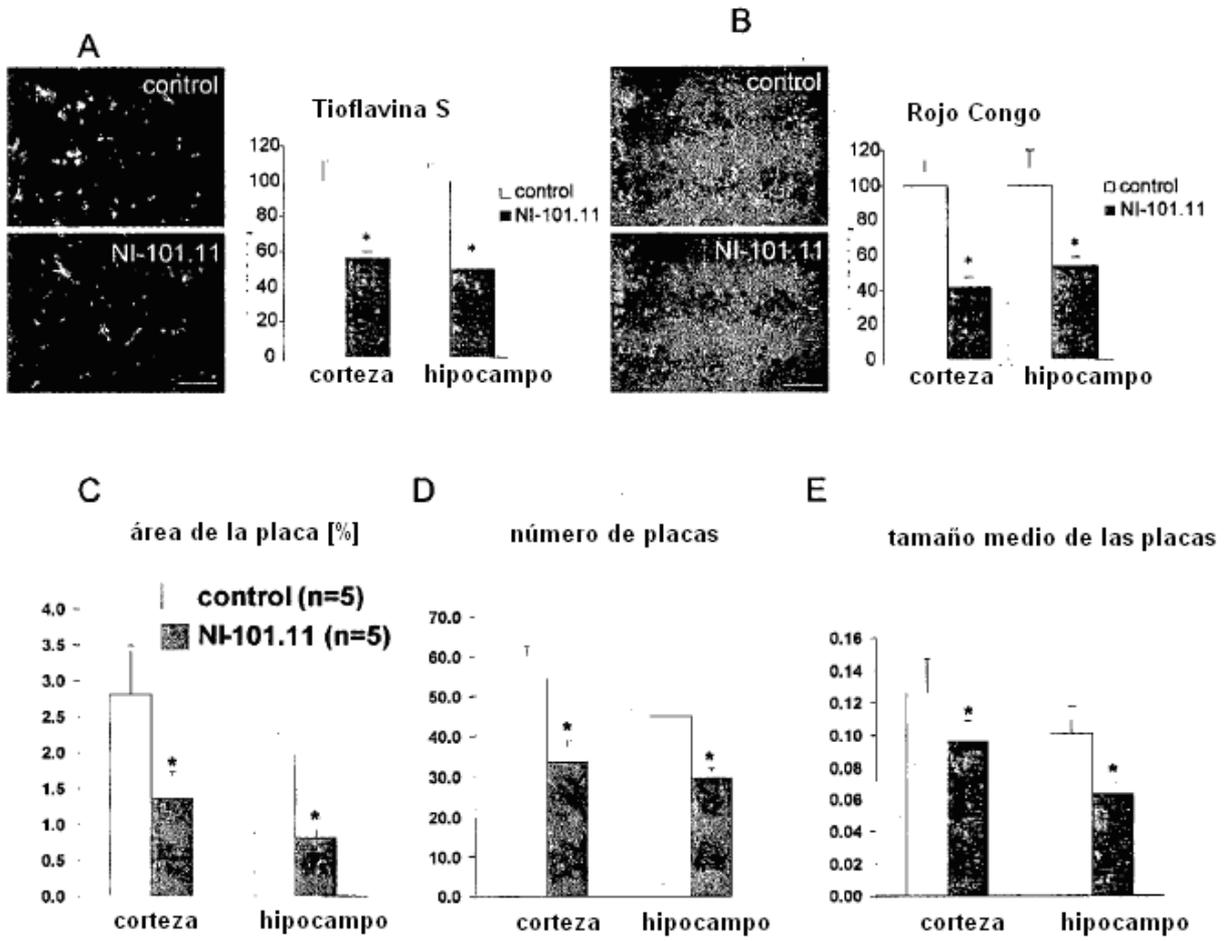


FIG. 18A-E

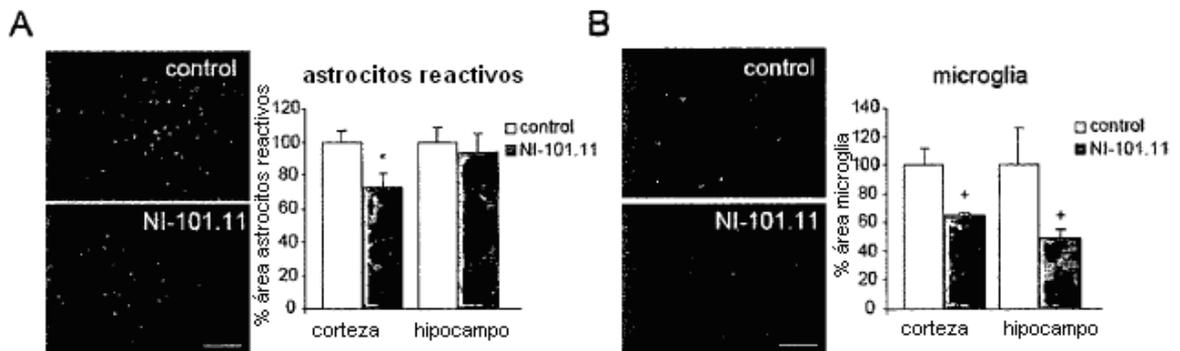
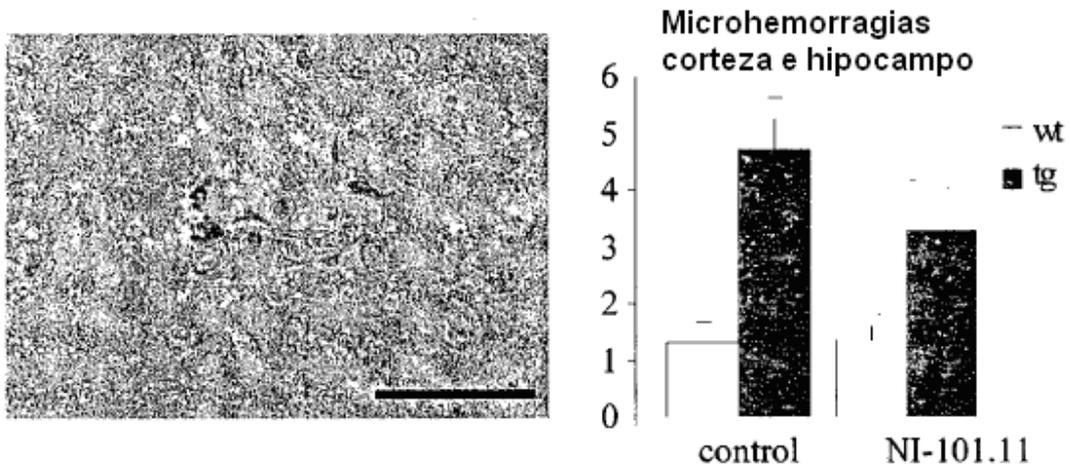
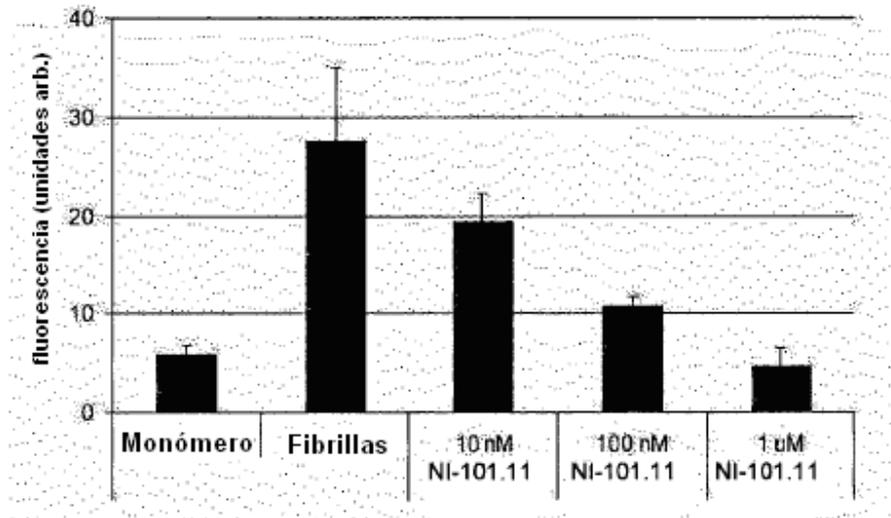


FIG. 19A-B



**FIG. 20**



**FIG. 21**

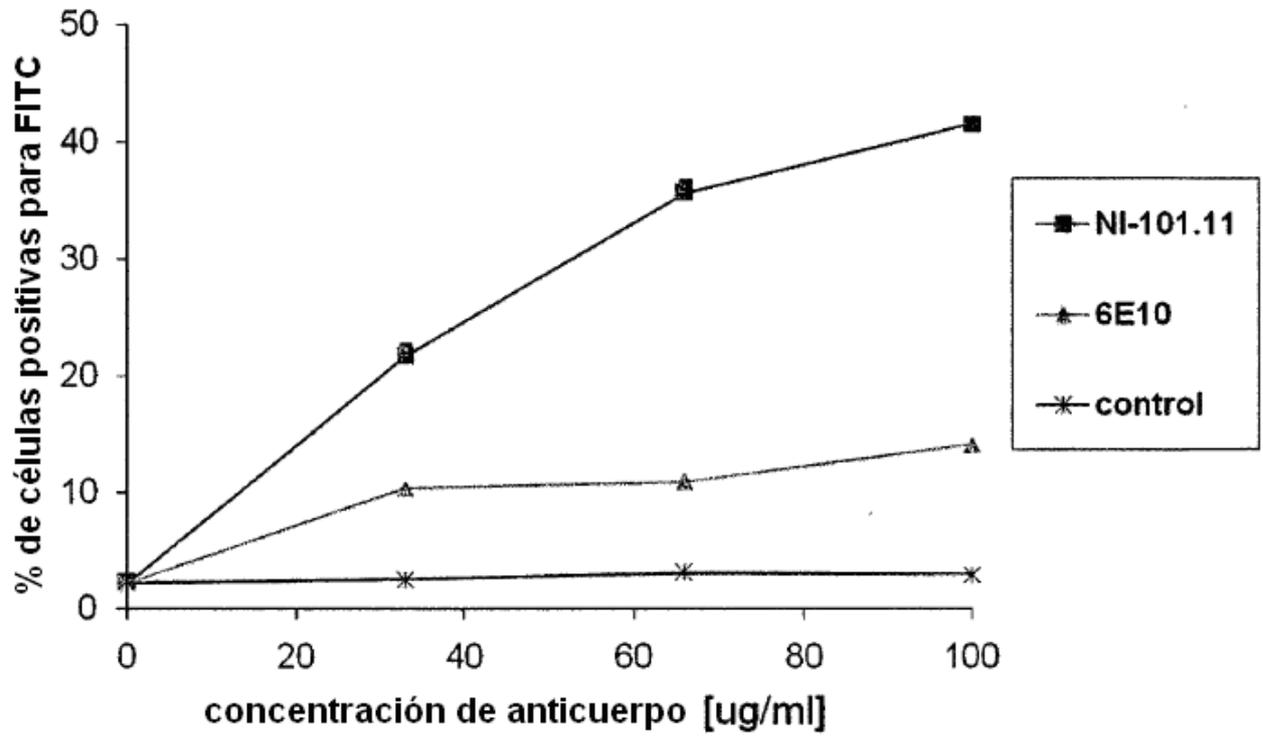


FIG. 22