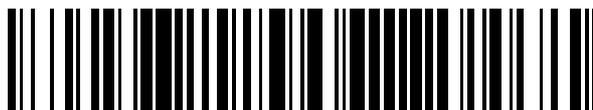


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 967**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2007 E 09178407 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2177536**

54 Título: **Anticuerpos contra el péptido "\*\*\*\*-amiloide**

30 Prioridad:

**30.03.2006 US 787588 P**

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

**12.08.2014**

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road  
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**BURBIDGE, STEPHEN ANTHONY;  
ELLIS, JONATHAN HENRY;  
FORD, SUSANNAH K.;  
GERMASCHEWSKI, VOLKER;  
KUMAR, UMESH;  
PHILPOTT, KAREN LOUISE y  
SODEN, PETER ERNEST**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 484 967 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el péptido  $\beta$ -amiloide

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen al péptido  $\beta$ -amiloide y en particular, al péptido  $\beta$ -amiloide humano. La presente invención también se refiere a procedimientos para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por niveles elevados de  $\beta$ -amiloide o de los depósitos de  $\beta$ -amiloide, particularmente la enfermedad de Alzheimer, con dichos anticuerpos, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y a procedimientos para su fabricación. Otros aspectos de la presente invención serán evidentes tras la descripción que se presenta más adelante.

**Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común del deterioro cognitivo relacionado con la edad, que afecta a más de 12 millones de individuos en todo el mundo (Citron M (2002) *Nat. Neurosci* 5, Supl. 1055-1057). Las primeras fases de la enfermedad se caracterizan por una pérdida progresiva de memoria con un deterioro cognitivo asociado y déficits del lenguaje y del comportamiento. En las últimas fases de la enfermedad, los pacientes desarrollan amnesia global y tienen la función motora muy reducida. La muerte se produce típicamente 9 años después del diagnóstico y a menudo está asociada con otras afecciones, típicamente neumonía (Davis K.L. y Samules S.C. (1998) en *Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders* eds Enna S. J. y Coyle J. T. (McGraw-Hill, Nueva York, páginas 267-316)). Las terapias actuales representan estrategias sintomáticas, que se centran en el alivio del deterioro cognitivo y en la mejora de los síntomas conductuales asociados con la etiología de la enfermedad en progreso. En la práctica estos tratamientos solo proporcionan un efecto beneficioso sobre la cognición de corta duración, notificándose una duración del nivel de deterioro cognitivo conseguido de tan solo hasta 2 años. El potencial de una terapia para modificar la enfermedad que ralentice y posiblemente detenga la progresión de la enfermedad es enorme. Tales estrategias proporcionarían mejoras radicales y sostenidas en la calidad de vida de los pacientes y de forma importante en sus cuidadores igual que reducen los enormes costes sanitarios globales de esta enfermedad.

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer se basa en una combinación de ensayos físicos y mentales que conducen al diagnóstico de una enfermedad de Alzheimer posible o probable. Después de la muerte la enfermedad se confirma por signos neurológicos bien caracterizados en el cerebro, que incluyen la deposición de A $\beta$  en placas parenquimatosas y vasos cerebrales, la formación intraneuronal de ovillos neurofibrilares, pérdida sináptica y pérdida de subpoblaciones neuronales en regiones específicas del cerebro (Terry, RD (1991) *J Neural Trans Supl.* 53: 141-145).

Una gran cantidad de evidencias genéticas, histológicas y funcionales sugieren que el péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) es clave en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, D. J. (2001) *Physiological Reviews* 81: 741-766).

Se sabe que A $\beta$  se produce por medio de la escisión de la proteína precursora de beta amiloide (también conocida como APP) por una enzima aspartil proteasa conocida como BACE1 (también conocida como  $\beta$ -secretasa, Asp2 o Memapsina-2) (De Strooper, B. y Konig, G. (1999) *Nature* 402: 471-472). Se ha postulado que además de la deposición parenquimática y vascular, ciertas formas oligoméricas solubles de A $\beta$  contribuyen a la aparición de EA y pueden afectar a la función neuronal inicialmente perjudicando a la función sináptica (Lambert y col. (1998) *Proceedings of the National Academy of Science, EE.UU.* 95: 6448-6453). Aunque se encuentran placas amiloides insolubles en las primeras fases de EA y de MCI, en estos individuos también están aumentados los niveles de agregados de A $\beta$  soluble (que reciben el nombre de oligómeros o ligandos difundibles derivados de A $\beta$  (ADDL) y los niveles de A $\beta$  soluble se correlacionan mejor con la degeneración neurofibrilar y la pérdida de marcadores sinápticos que las placas de amiloide (Naslund y col. (2000) *J Am Med Assoc* 283: 1571-1577, Younkin, S. (2001) *Nat. Med.* 1: 8-19). El A $\beta$ 42 altamente amiloidogénico y las formas truncadas en el extremo amino A $\beta$ x-42 son las especies predominantes de A $\beta$  encontradas tanto en placas difusas como en placas seniles (Iwatsubo, T (1994) *Neuron.* 13:45-53, Gravina, SA (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 7013-7016). Los niveles relativos de A $\beta$ 42 parecen ser el regulador clave de la agregación de A $\beta$  en placas amiloides, de hecho se ha demostrado que A $\beta$ 42 forma agregados más rápidamente que otras formas de A $\beta$  *in vitro* (Jarrett, JT (1993) *Biochemistry.* 32: 4693-4697) y A $\beta$ 42 como tal se ha implicado como molécula iniciadora en la patogénesis de la EA (Younkin SG, (1998) *J. Physiol. (Paris).* 92: 289-292). Aunque A $\beta$ 42 es un producto minoritario del metabolismo de APP, los pequeños cambios en su producción están asociados con grandes efectos sobre la deposición de A $\beta$  por lo tanto se ha postulado que la reducción de A $\beta$ 42 sola puede ser una forma eficaz de tratar la EA (Younkin SG, (1998) *J. Physiol. (Paris).* 92: 289-292). Respaldao esto, se ha informado que mutaciones en los genes de la proteína precursora de amiloide (APP) y de la presenilina aumentan predominantemente los niveles relativos de A $\beta$ 42 y por lo tanto acortan el tiempo hasta la aparición de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Selkoe D.J., Podlisny M.B. (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Gemet.* 3: 67-99). Debe tenerse en cuenta sin embargo, que la velocidad de deposición también depende del catabolismo y eliminación de A $\beta$ .

Se han generado modelos animales de la deposición de amiloides por sobreexpresión de transgenes humanos

mutantes en ratones. Los ratones que sobreexpresan transgenes de APP humanos individuales típicamente desarrollan depósitos de  $\beta$ -amiloide del tipo de placas cerebrales desde los 12 meses de edad (Games D. y col., (1995) *Nature* 373: 523-527; Hsiao K. y col., (1996) *Science* 274: 99-102)), mientras que los ratones que llevan transgenes tanto de APP humana mutante como de presenilina-1 (PS-1) típicamente desarrollan depósitos de  $\beta$ -amiloide del tipo de placas cerebrales tan pronto como a los 2 meses de edad (Kurt M.A. y col., (2001) *Exp.Neurol.* 171: 59-71; McGowan E. y col., (1999) *Neurobiol. Dis.* 6: 231-244).

Se ha hecho cada vez más evidente que el transporte de  $A\beta$  exógeno entre el sistema nervioso central (SNC) y el plasma juega un papel en la regulación de los niveles de amiloide cerebrales (Shibata y col. (2000) *J Clin Invest* 106: 1489-1499), transportándose el  $A\beta$  del LCR rápidamente desde el LCR hasta el plasma. Por lo tanto la vacunación activa con péptidos  $A\beta$  o la administración pasiva de anticuerpos específicos contra  $A\beta$  se une rápidamente al  $A\beta$  periférico alterando el equilibrio dinámico entre el plasma, el LCR y finalmente el SNC. De hecho ahora hay una gran cantidad de estudios que han demostrado que estas dos estrategias pueden reducir los niveles de  $A\beta$ , reducir la patología producida por  $A\beta$  y proporcionar beneficios cognitivos en diversos modelos transgénicos de amiloidosis. También se han realizado estudios limitados en especies superiores. Se inmunizaron monos verdes caribeños (de 16-10 años de edad) con péptido  $A\beta$  durante 10 meses. Los niveles de  $A\beta_{40}$  se elevaron 2-5 veces en el plasma, alcanzando un máximo en 251 días mientras que los niveles en el LCR de  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  se redujeron significativamente en 100 días y volvieron al nivel inicial a partir de entonces. Esta reducción en el LCR estuvo acompañada de una reducción significativa en la carga de placas (Lemere, CA (2004) *Am J Pathology* 165: 283-297). También se detectaron aumentos similares en los niveles plasmáticos de  $A\beta$  después de la inmunización de monos Rhesus de edad avanzada (de 15-20 años de edad) (Gandy, S (2004) *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18: 44:46).

La primera terapia inmune dirigida a los amiloides cerebrales fue AN-1792 de Elan/Wyeth, una vacuna activa. Este tratamiento se terminó después del desarrollo de signos clínicos coherentes con meningoencefalitis. Los análisis de subgrupos sugirieron que el tratamiento ralentizaba el deterioro de la función cognitiva (*Nature Clin Pract Neurol* (2005) 1: 84-85). El análisis post-mortem de los pacientes también mostró pruebas de eliminación de placas (Gilman S. y col., (2005) *Neurology* 64 (9) 1553-1562). Se ha demostrado que Bapineuzumab (AAB-001, Elan/Wyeth), una terapia pasiva de MAb, mejora significativamente las puntuaciones de cognición en un pequeño estudio de seguridad de fase I.

Se conocen en la técnica numerosos anticuerpos que se unen a péptidos  $\beta$ -amiloides. Por ejemplo el documento WO2004/08419 divulga un anticuerpo monoclonal 3D6 que se une a un epítipo de amiloide  $\beta$  que está localizado en el extremo N-terminal del péptido. La sustitución del primer aminoácido de dicho péptido dio como resultado unión por 3D6 con afinidad reducida.

Otras enfermedades o trastornos caracterizados por niveles de  $\beta$ -amiloide elevados o depósitos de  $\beta$ -amiloide elevados incluyen el deterioro cognitivo leve (MCI, Blasko I (2006) *Neurobiology of aging* "Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine" en prensa, e-publicado el 19 de octubre de 2006), la hemorragia cerebral hereditaria con  $\beta$ -amiloidosis de tipo Dutch, la angiopatía  $\beta$ -amiloide cerebral y diversos tipos de demencias degenerativas, tales como las asociadas con la enfermedad de Parkinson, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración basal cortical y la enfermedad de Alzheimer del tipo cuerpos de Lewy difusos (Mollenhauer B (2007) *J Neural Transm* e-publicado el 23 de febrero de 2007, van Oijen, M *Lancet Neurol.* 2006 5: 655-60) y síndrome de Down (Mehta, PD (2007) *J Neurol Sci.* 254: 22-7).

### Sumario de la invención

En un aspecto de la presente divulgación se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado de los mismos que se une a péptido  $\beta$ -amiloide 1-12 (SEC ID N.º: 15) con constante de equilibrio KD de menos de 100 pM pero no se une a péptido  $\beta$ -amiloide 2-13 (SEC ID N.º: 44), haciéndose ambas determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando péptido capturado en chip de estreptavidina.

En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado de los mismos que se une a péptido  $\beta$ -amiloide 1-12 (SEC ID N.º: 15) con constante de equilibrio KD de menos de 100 pM y tiene una constante de equilibrio KD para unión a péptido  $\beta$ -amiloide 2-13 (SEC ID N.º: 44) que es 1000 veces mayor que la del péptido 1-12 (SEC ID N.º: 15), haciéndose ambas determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando péptido capturado en chip de estreptavidina.

En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado de los mismos que se une a péptido  $\beta$ -amiloide 1-12 (SEC ID N.º: 15) con constante de equilibrio KD de menos de 100 pM y tiene una constante de equilibrio KD para unión a péptido  $\beta$ -amiloide 2-13 (SEC ID N.º: 44) que es 10000 veces mayor que la del péptido 1-12 (SEC ID N.º: 15), haciéndose ambas determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando péptido capturado en chip de estreptavidina.

En un aspecto el ensayo de resonancia de plasmón superficial que utiliza péptido capturado en chip de estreptavidina es el ensayo de resonancia de plasmón superficial descrito en el ejemplo más adelante. En otro aspecto el ensayo de resonancia de plasmón superficial que utiliza péptido capturado en chip de estreptavidina es el Procedimiento A(i) descrito en el análisis de SPR Biacore™ más adelante.

- 5 En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado de los mismos que se une a péptido  $\beta$ -amiloide 1-40 con constante de equilibrio KD de menos de 10 nM pero no se une al péptido  $\beta$ -amiloide 2-13 (SEC ID N.º: 44), haciéndose ambas determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial descrito en el Procedimiento B de los ejemplos más adelante.
- 10 En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado de los mismos que se une a péptido  $\beta$ -amiloide 1-40 con constante de equilibrio KD de menos de 10 nM y tiene una constante de equilibrio KD para unión a péptido  $\beta$ -amiloide 2-13 (SEC ID N.º: 44) que es 1000 veces mayor que la del péptido 1-12 (SEC ID N.º: 15), haciéndose ambas determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial descrito en el Procedimiento B de los ejemplos más adelante.
- 15 En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado de los mismos que se une a péptido  $\beta$ -amiloide 1-40 con constante de equilibrio KD de menos de 10 nM y tiene una constante de equilibrio KD para unión a péptido  $\beta$ -amiloide 2-13 (SEC ID N.º: 44) que es 10000 veces mayor que la del péptido 1-12 (SEC ID N.º: 15), haciéndose ambas determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial descrito en el Procedimiento B de los ejemplos más adelante.
- 20 En una realización de la invención de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado de los mismos que se une a péptido  $\beta$ -amiloide y que comprende las siguientes CDR:

CDRH1: DNGMA (SEC ID N.º: 1)

CDRH2: FISNLAYSIDYADTVTG (SEC ID N.º: 2)

- 25 CDRH3: GTWFAY (SEC ID N.º: 3)

dentro de un armazón de una región variable de cadena pesada humana que se origina a partir de la familia de genes VH3 y:

CDRL1: RVSQSLLSNGYTYLH (SEC ID N.º: 4)

CDRL2: KVSNRFS (SEC ID N.º: 5)

- 30 CDRL3: SQTRHVPYT (SEC ID N.º: 6)

dentro de un armazón de una región variable de cadena ligera humana que se origina a partir de la secuencia de aminoácidos desvelada en la SEC ID N.º: 24.

- 35 A lo largo de toda esta memoria descriptiva, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRL3'", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat como se expone en Kabat y cols.; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987. Por lo tanto lo siguiente define los CDR de acuerdo con la invención.

**CDR: Residuos**

CDRH1: 31-35B

CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-102

- 40 CDRL1: 24-34

CDRL2: 50-56

CDRL3: 89-97

- 45 La familia de genes VH3 y la nomenclatura de genes de inmunoglobulina relacionada se describe en Matsuda y cols. (Journal of Experimental Medicine, 188: 2151-2162, 1998) y Lefranc & Lefranc (The Immunoglobulin Factsbook. 2001. Academic Press, Londres).

En una realización particular, la región variable de cadena pesada humana se origina a partir de:

-un gen V seleccionado del siguiente subgrupo de miembros de la familia VH3: VH3-48, VH3-21, VH3-11, VH3-7,

VH3-13, VH3-74, VH3-64, VH3-23, VH3-38, VH3-53, VH3-66, VH3-20, VH3-9 y VH3-43

-un gen V seleccionado del siguiente subgrupo de los miembros de la familia VH3: VH3-48, VH3-21 y VH3-11; o

-el gen VH3-48.

5 La secuencia en la entrada del banco de genes M99675 es un alelo del gen VH3-48. M99676 es una secuencia nucleotídica del banco de genes de una parte genómica del ADN que incluye los dos exones que constituyen el gen de cadena pesada humana VH3-48 (SEC ID N.º: 22) y codifican la secuencia de aminoácidos de región variable dada en SEC ID N.º: 21. En un aspecto particular el armazón de cadena pesada aceptora humana se deriva de M99675.

10 Con el fin de construir una región V completa se ha de añadir un armazón 4 al gen V M99675 codificado en la línea germinal. Secuencias de armazón 4 adecuadas incluyen la codificada por el minigén JH4 humano (Kabat):

YFDYWGQGTLVTVSS (SEC ID N.º: 23)

de la que los cuatro residuos iniciales caen dentro de la región CDR3 que se reemplaza por la CDR que entra del anticuerpo donante.

15 La persona experta aprecia que un gen V de la línea germinal y un gen J no incluyen secuencia codificante para la totalidad de la cadena pesada CDR3. Sin embargo, en los anticuerpos de la invención, la secuencia CDR3 está proporcionada por la inmunoglobulina donante. De acuerdo con ello, la combinación de un gen VH tal como VH3-48, un minigén tal como JH4 y un grupo de CDR de cadena pesada tales como SEC ID N.º: 1, SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 3 (ensambladas en una manera tal como para imitar una región variable de cadena pesada totalmente reordenada madura) es suficiente para definir una región variable de cadena pesada de la invención tal como  
20 aquella representada en SEC ID N.º: 26, 28, 30.

La región variable codificada por Genpept ID CAA51134 tiene la secuencia de aminoácidos dada en SEC ID N.º: 24.

25 La secuencia del armazón de región variable de cadena ligera conocida por el GenPept ID CAA51134 es la secuencia de aminoácidos deducida de una región variable de de cadena ligera totalmente reordenada y es idéntica a otra secuencia de aminoácidos con los mismos armazones en la base de datos: número de acceso de Genpept S40356, y se describe en Klein, R., y cols., Eur. J. Immunol. 23 (12), 3248-3262 (1993). La secuencia codificante de ADN para CAA51134, accesible como N.º de acceso de Genbank X72467, se da como SEC ID N.º: 25.

30 En un aspecto particular de la invención el armazón de cadena pesada aceptora humana se deriva de M99675 y del minigén JH4 y el armazón de cadena ligera aceptora humana se deriva de CAA51135, conteniendo opcionalmente una o más, tal como de una a cuatro, más particularmente de una a tres, sustituciones de residuos de aminoácidos basadas en los residuos correspondientes encontrados en el dominio V<sub>H</sub> donador que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 17 y dominio V<sub>L</sub> que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 19 que mantiene toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo donante por péptido β-amiloide.

Por "sustancialmente toda la afinidad de unión" se quiere decir que el anticuerpo terapéutico tiene como mucho una reducción en afinidad de unión comparada con el anticuerpo donador de diez veces.

35 En un aspecto más particular el armazón de cadena pesada aceptora humana derivado de M99675 y JH4 tiene una a cuatro sustituciones de residuos de aminoácidos seleccionados de posiciones 24, 48, 93 y/o 94 (numeración de Kabat).

En un aspecto más particular de la invención el armazón de cadena pesada aceptora humana derivado de M99675 y JH4 comprende los siguientes residuos (o un sustituto conservador de la misma):

40 (i)

Posición	Residuo
93	V
94	S

o

45 (ii)

Posición	Residuo
24	V
93	V

94 S

o

(iii)

	Posición	Residuo
5	24	I
	93	V
	94	S

En otra realización de la invención se da a conocer una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención.

10 En una realización adicional de la invención se da a conocer un procedimiento para tratar un paciente humano aquejado de una enfermedad relacionada con el péptido  $\beta$ -amiloide procedimiento que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención.

15 Se proporciona también el uso de un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el péptido  $\beta$ -amiloide.

En otra realización de la invención se da a conocer un procedimiento para la elaboración de un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención, procedimiento que comprende expresar polinucleótido que codifica el anticuerpo en una célula huésped.

20 En una realización particular el anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento y/o derivado de los mismos carece esencialmente de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

## Descripción detallada de la invención

### 1. Estructuras de anticuerpo

#### 1.1 Anticuerpos intactos

25 Los anticuerpos intactos normalmente son glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Aparte de IgM, los anticuerpos intactos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 KDa, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera se une a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene enlaces disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ) seguido de varias regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable ( $V_L$ ) y una región constante en su otro extremo; la región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos denominados Kappa y Lambda basándose en la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos pueden asignarse a cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA pueden subdividirse adicionalmente en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existen variantes de especie teniendo el ratón y la rata al menos IgG2a, IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere especificidad de unión al anticuerpo, representando ciertas regiones una variabilidad particular y denominándose regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las partes más conservadas de la región variable se denominan regiones de armazón (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera intactas comprende cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas por las regiones FR y con las CDR de la otra cadena contribuyen a la formación de los sitios de unión a antígeno de los anticuerpos. Las regiones constantes no están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras tales como la participación en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis a través de la unión al receptor Fc $\gamma$ , la semivida/velocidad de eliminación a través del receptor neonatal de Fc (FcRn) y la citotoxicidad dependiente del complemento a través del componente C1q de la cascada del complemento. La región constante de IgG2 humana carece de la capacidad de activar el complemento por la ruta clásica o de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La región constante de IgG4 carece de la capacidad de activar el complemento por la ruta clásica y media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos solo débilmente. Los anticuerpos que carecen esencialmente de estas funciones efectoras pueden denominarse anticuerpos "no líticos".

50

### 1.1.1 Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos pueden producirse por varios procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos humanos pueden obtenerse por el procedimiento de hibridoma usando líneas celulares de mieloma humano o heteromieloma de ratón-humano, véanse Kozbor J. *Immunol* 133, 3001, (1984) y Brodeur, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los procedimientos alternativos incluyen el uso de bibliotecas de fagos o ratones transgénicos utilizando en ambos casos repertorios de regiones V humanas (véanse Winter G., (1994), *Annu. Rev. Immunol* 12, 433-455, Green LL (1999), *J. Immunol. methods* 231, 11-23).

Actualmente se dispone de varias cepas de ratones transgénicos donde sus loci de inmunoglobulina de ratón se han reemplazado con segmentos de genes de inmunoglobulina humana (véanse Tomizuka K, (2000) *PNAS* 97, 722-727; Fishwild D.M (1996) *Nature Biotechnol.* 14, 845-851, Méndez MJ, 1997, *Nature Genetics*, 15, 146-156). Tras la exposición a antígenos estos ratones pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos a partir de los que pueden seleccionarse los anticuerpos de interés.

Debe indicarse particularmente el sistema Trimer<sup>TM</sup> (véase Eren R y col., (1998) *Immunology* 93: 154-161) en el que se trasplantan linfocitos humanos en ratones sometidos a radiación, el Sistema de Anticuerpos de Linfocitos Seleccionados (SLAM, véase Babcook y col., *PNAS* (1996) 93: 7843-7848) en el que se pasan eficazmente linfocitos humanos (o de otras especies) a través de un procedimiento de generación masiva de anticuerpos reunidos *in vitro* seguido de un procedimiento simplificado de dilución limitante y selección y el Xenomouse II<sup>TM</sup> (Abgenix Inc). En Morphotek Inc está disponible una estrategia alternativa que usa la tecnología Morphodoma<sup>TM</sup>.

La tecnología de presentación de fagos puede usarse para producir anticuerpos humanos (y fragmentos de los mismos), véanse McCafferty; *Nature*, 348, 552-553 (1990) y Griffiths EA y col. (1994) *EMBO* 13: 3245-3260. De acuerdo con esta técnica se clonan genes del dominio V de anticuerpos en fase en un gen de la proteína principal o minoritaria de la cubierta de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se presentan (normalmente con la ayuda de un fago auxiliar) como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo tienen como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. La técnica de presentación en fagos puede usarse para seleccionar anticuerpos con especificidad de antígeno a partir de bibliotecas realizadas a partir de células B humanas tomadas de individuos que padecen una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o, como alternativa, a partir de donantes humanos no inmunizados (véase Marks; *J. Mol. Bio.* 222, 581-597, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que comprende un dominio Fc, es necesario volver a clonar el fragmento derivado presentado en el fago en un vector de expresión de mamífero que comprende las regiones constantes deseadas y establecer líneas celulares de expresión estable.

Puede usarse la técnica de maduración por afinidad (Marks; *Bio/technol* 10,779-783 (1992)) para mejorar la afinidad de unión, en la que la afinidad del anticuerpo humano primario se mejora reemplazando secuencialmente las regiones V de cadena H y L por variantes de origen natural y seleccionando basándose en las afinidades de unión mejoradas. Ahora también se dispone de variantes de esta técnica tales como "impronta de epítipo", véase el documento WO 93/06213. Véase también Waterhouse; *Nucl. Acids Res* 21, 2265-2266 (1993).

### 1.2 Anticuerpos quiméricos y humanizados

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos lleva asociados los nuevos problemas bien establecidos de inmunogenicidad potencial, especialmente tras la administración repetida del anticuerpo es decir el sistema inmune del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como extraño y crear una respuesta neutralizadora. Además de desarrollar anticuerpos totalmente humanos (véase anteriormente), se han desarrollado diversas técnicas a lo largo de los años para solucionar estos problemas y generalmente implican la reducción de la composición de secuencias de aminoácidos no humanas en el anticuerpo terapéutico intacto mientras se mantiene la facilidad relativa para obtener anticuerpos no humanos a partir de un animal inmunizado por ejemplo, un ratón, rata o conejo. En general, se han usado dos estrategias para conseguir esto. La primera son anticuerpos quiméricos, que generalmente comprenden un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor, tal como ratón) fusionado a una región constante humana. Como el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo está localizado dentro de las regiones variables el anticuerpo quimérico mantiene su afinidad de unión por el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y por lo tanto, puede realizar funciones efectoras tales como las descritas anteriormente. Los anticuerpos quiméricos típicamente se producen usando procedimientos de ADN recombinante. Se aísla el ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo, ADNc) y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las regiones variables de cadena H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo, ADN de las SEC ID N° 18 y 20 descritas anteriormente). Las células de hibridoma sirven como fuente típica de este ADN. Una vez aislado, el ADN se pone en vectores de expresión que después se utilizan para transfectar células huésped tales como *E. coli*, células COS, células CHO, células PerC6 o células de mieloma que no producen de otra forma proteína inmunoglobulina para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo las secuencias codificantes para cadenas L y H humanas por las correspondientes regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo murinas), véase, por ejemplo, Morrison;

PNAS 81, 6851 (1984). De esta manera, en otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico que comprende un dominio V<sub>H</sub> que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 17 y un dominio V<sub>L</sub> que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 19 fusionados a una región constante humana (que puede ser de isotipo IgG, por ejemplo, IgG1).

5 La segunda estrategia implica la generación de anticuerpos humanizados en los que el contenido no humano del anticuerpo se ha reducido humanizando las regiones variables. Han ganado popularidad dos técnicas para la humanización. La primera es la humanización por injerto de CDR. Las CDR forman bucles próximos al extremo N-terminal del anticuerpo, donde forman una superficie montada en un soporte proporcionado por las regiones de armazón. La especificidad de unión a antígeno del anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características químicas de su superficie de CDR. Estas características a su vez se determinan por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los residuos que comprenden las CDR. Puede conseguirse una gran disminución de la inmunogenicidad injertando solo las CDR de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) (anticuerpos "donadores") en regiones de armazón ("región de armazón aceptora") y constantes humanas adecuadas (véanse Jones y col. (1986) Nature 321, 522-525 y Verhoeyen M y col. (1988) Science 239, 1534-1536). Sin embargo, el injerto de CDR *per se* puede no producir la retención completa de las propiedades de unión al antígeno y a menudo se encuentra que es necesario conservar algunos residuos de armazón del anticuerpo donador (lo que recibe el nombre en algunas ocasiones de "retromutaciones") en la molécula humanizada si se desea recuperar una afinidad de unión al antígeno significativa (véanse Queen C y col. (1989) PNAS 86, 10.029-10.033, Co, M y col. (1991) Nature 351, 501-502). En este caso, las regiones V humanas que muestran la mayor homología de secuencia (típicamente del 60% o superior) con el anticuerpo donador no humano pueden elegirse de una base de datos para proporcionar la región de armazón (FR) humana. La selección de FR humanas puede realizarse bien a partir de anticuerpos humanos individuales o bien a partir de anticuerpos consenso humanos. Donde sea necesario en la región de armazón aceptora humana están sustituidos los residuos clave del anticuerpo donador para conservar las conformaciones de CDR. Puede usarse la creación de modelos del anticuerpo por ordenador para ayudar a identificar estos residuos estructuralmente importantes, véase el documento WO99/48523.

Como alternativa, la humanización puede conseguirse por un procedimiento de "enchapado". Un análisis estadístico de regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana y murina únicas reveló que los patrones precisos de residuos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos y la mayoría de las posiciones superficiales individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de residuos diferentes (véanse Padlan E.A. y col.; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 y Pedersen J.T. y col. (1994) J.Mol.Biol. 235; 959-973). Por lo tanto es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano reemplazando residuos expuestos en sus regiones de armazón que difieren de los que se encuentran normalmente en los anticuerpos humanos. Como la antigenicidad de las proteínas puede correlacionarse con la accesibilidad de la superficie, el reemplazo de residuos de la superficie puede ser suficiente para hacer que la región variable de ratón sea "invisible" al sistema inmune humano (véase también Mark G.E. y col. (1994) en *Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, páginas 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "enchapado" porque solo se altera la superficie del anticuerpo, los residuos de soporte permanecen sin cambios. Otras estrategias alternativas incluyen la indicada en el documento WO04/006955 y el procedimiento de Humaneering™ (Kalobios) que hace uso de sistemas de expresión bacterianos y produce anticuerpos próximos a la línea germinal humana en secuencia (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics enero de 2007, San Diego, California).

Los expertos en la materia apreciarán que el término "derivado" pretende definir no solo la fuente en el sentido de ser el origen *físico* del material, sino también definir un material que es estructuralmente idéntico al material pero que no procede de la fuente de referencia. De esta manera, los "residuos encontrados en el anticuerpo donador" no necesitan haberse purificado obligatoriamente a partir del anticuerpo donador.

En la técnica está bien reconocido que ciertas sustituciones de aminoácidos se consideran "conservadoras". Los aminoácidos se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral y las sustituciones dentro de grupos que mantienen toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo terapéutico de la invención se consideran sustituciones conservadoras, véase la siguiente Tabla 1:

50

**Tabla 1**

<u>Cadena lateral</u>	<u>Miembros</u>
Hidrófoba	Met, Ala, Val, Leu, Ile
Hidrófila neutra	Cys, Ser, Thr
Ácida	Asp, Glu
Básica	Asn, Gln, His, Lys, Arg

(continuación)

<u>Cadena lateral</u>	<u>Miembros</u>
residuos que afectan a la orientación de la cadena	Gly, Pro
Aromática	Trp, Tyr, Phe

### 1.3 Anticuerpos biespecíficos

Un anticuerpo biespecífico es un derivado de anticuerpo que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopes diferentes y también forma parte de la invención. Los procedimientos de fabricación de estos anticuerpos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena H-cadena L de inmunoglobulina, donde las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión, véanse Millstein y col., Nature 305 537-539 (1983), el documento WO93/08829 y Traunecker y col. EMBO, 10, 1991, 3655-3659. Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de diez estructuras de anticuerpo diferentes de las que solo una tiene la especificidad de unión deseada. Una estrategia alternativa implica la fusión de los dominios variables con las especificidades de unión deseadas para la región constante de cadena pesada que comprende al menos parte de la región de bisagra y las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la región CH1 que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica estas fusiones y si se desea la cadena L se insertan en vectores de expresión distintos y después de utilizan para cotransfectar un organismo huésped adecuado. Sin embargo es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas en un vector de expresión. En una estrategia preferida, el anticuerpo biespecífico se compone de una cadena H con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadenas H-L, que proporcionan una segunda especificidad de unión en el otro brazo, véase el documento WO94/04690. Véase también Suresh y col. Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

La administración de proteínas terapéuticas en el cerebro se ha visto obstaculizada por la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB). Cuando se desea administrar un anticuerpo de la invención o un fragmento de anticuerpo de la invención a través de la BBB, se han propuesto varias estrategias para mejorar dicha administración en caso necesario.

Para obtener los nutrientes y factores necesarios a partir de la sangre, la BBB posee algunos receptores específicos que transportan compuestos desde la sangre circulante al cerebro. Ciertos estudios han indicado que algunos compuestos tales como la insulina (véase Duffy K. R. y col. (1989) Brain Res. 420: 32-38), la transferrina (véase Fishman J. B. y col. (1987) J. Neurosci 18: 299-304) y los factores de crecimiento semejantes a la insulina 1 y 2 (véanse Pardridge WM (1986) Endocrine Rev.7: 314-330 y Duffy K. R. y col. (1986) Metabolism 37: 136-140) atraviesan la BBB por medio de transcitosis mediada por receptor. De esta manera, los receptores para estas moléculas proporcionan un medio potencial para que los anticuerpos de la invención accedan al cerebro usando los denominados anticuerpos "vectorizados" (véase Pardridge WM (1999) Advanced Drug Delivery Review 36: 299-321). Por ejemplo, se ha demostrado que un anticuerpo contra el receptor de transferrina se transporta dinámicamente al parénquima cerebral (véanse Friden PM y col. (1991) PNAS 88: 4771-4775 y Friden PM y col. (1993) Science 259: 373-377). De esta manera, una estrategia potencial es producir un anticuerpo específico o un fragmento biespecífico tal como se ha descrito anteriormente en la que una primera especificidad es hacia y una segunda especificidad es hacia un receptor de transporte localizado en la BBB, por ejemplo, una segunda especificidad hacia el receptor de transporte de transferrina.

### 1.4 Fragmentos de anticuerpo

En ciertas realizaciones de la invención se proporciona anticuerpo terapéutico que es un fragmento de unión a antígeno. Tales fragmentos pueden ser fragmentos de unión a antígeno funcionales de anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos tales como fragmentos Fab, Fd, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, ScFv de los anticuerpos descritos anteriormente. Los fragmentos que carecen de la región constante carecen de la capacidad de activar el complemento por la ruta clásica o de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Tradicionalmente tales fragmentos se producen por la digestión proteolítica de anticuerpos intactos por ejemplo por digestión con papaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/29348) pero pueden producirse directamente a partir de células huésped transformadas de manera recombinante. Para la producción de ScFv, véase Bird y col.; (1988) Science, 242, 423-426. Además, pueden producirse fragmentos de anticuerpo usando una diversidad de técnicas de ingeniería genética como se describen más adelante.

Los fragmentos Fv parecen tener menos energía de interacción de sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para establecer la asociación de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, se han asociado con péptidos (Bird y col., (1988) Science 242, 423-426, Huston y col., PNAS, 85, 5879-5883), puentes disulfuro (Glockshuber y col., (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) y mutaciones de "acoplamiento" (Zhu y col. (1997), Protein Sci., 6, 781-788). Los fragmentos ScFv pueden

producirse por procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, véanse Whitlow y col. (1991) *Methods companion Methods Enzymol*, 2, 97-105 y Huston y col. (1993) *Int. Rev. Immunol* 10, 195-217. Los fragmentos ScFv pueden producirse en células bacterianas tales como *E. coli* pero más típicamente se producen en células eucariotas. Un inconveniente de ScFv es la monovalencia del producto, que descarta una avidéz incrementada debida a la unión polivalente y a su corta semivida. Los intentos de solucionar estos problemas incluyen (ScFv)<sub>2</sub> bivalente producido a partir de ScFv que contiene un residuo de cisteína C-terminal adicional por acoplamiento químico (Adams y col. (1993) *Can. Res* 53, 4026-4034 y McCartney y col. (1995) *Protein Eng.* 8, 301-314) o por dimerización espontánea con especificidad de sitio de ScFv que contiene un residuo de cisteína C-terminal no emparejado (véase Kipriyanov y col. (1995) *Cell. Biophys* 26, 187-204). Como alternativa, puede forzarse a ScFv a formar multímeros por acortamiento del engarce peptídico a entre 3 y 12 residuos para formar "diacuerpos", véase Holliger y col. *PNAS* (1993), 90, 6444-6448. La reducción del engarce aún adicional puede producir trímeros de ScFv ("triacuerpos", véase Kortt y col. (1997) *Protein Eng*, 10, 423-433) y tetrámeros ("tetracuerpos", véase Le Gall y col. (1999) *FEBS Lett*, 453, 164-168). La construcción de moléculas de ScFv bivalentes también puede conseguirse por fusión genética con restos de dimerización de proteínas para formar "minianticuerpos" (véase Pack y col. (1992) *Biochemistry* 31, 1579-1584) y "minicuerpos" (véase Hu y col. (1996), *Cancer Res.* 56, 3055-3061). También pueden producirse tándems ScFv-Sc-Fv ((ScFv)<sub>2</sub>) uniendo dos unidades de ScFv por un tercer engarce peptídico, véase Kurucz y col. (1995) *J.Immol.*154, 4576-4582. Los diacuerpos biespecíficos pueden producirse por medio de la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadena única que consisten en un dominio V<sub>H</sub> de un anticuerpo conectado por un engarce corto al dominio V<sub>L</sub> de otro anticuerpo, véase Kipriyanov y col. (1998), *Int. J. Can* 77, 763-772. La estabilidad de tales diacuerpos biespecíficos puede mejorarse por medio de la introducción de puentes disulfuro o de mutaciones de "acoplamiento" como se ha descrito anteriormente o por la formación de diacuerpos de hélice única (ScDb) en los que dos fragmentos de ScFv híbridos están conectados a través de un engarce peptídico, véase Kontermann y col. (1999) *J. Immunol. Methods* 226 179-188. Moléculas tetravalentes biespecíficas están disponibles por ejemplo fusionando un fragmento ScFv al dominio CH3 de una molécula de IgG o a un fragmento Fab a través de la región de bisagra, véase Coloma y col. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 159-163. Como alternativa, se han creado moléculas tetravalentes biespecíficas por la fusión de diacuerpos de hélice única biespecíficos (véase Alt y col., (1999) *FEBS Lett* 454, 90-94). También pueden formarse moléculas biespecíficas tetravalentes menores por la dimerización bien de tándems ScFv-ScFv con un engarce que contiene un resto de hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller y col. (1998) *FEBS Lett* 432, 45-49) o bien una molécula de hélice única que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>) en una orientación que evita el emparejamiento intramolecular (diacuerpo en tándem, véase Kipriyanov y col., (1999) *J. Mol. Biol.* 293, 41-56). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> biespecíficos pueden crearse por acoplamiento químico de fragmentos Fab' o por heterodimerización a través de cremalleras de leucina (véanse Shalaby y col., (1992) *J. Exp. Med.* 175, 217-225 y Kostelny y col. (1992), *J. Immunol.* 148, 1547-1553). También se dispone de dominios aislados de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, véanse los documentos US 6.248.516; US 6.291.158; y US 6.172.197.

### 1.5 Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados son derivados que también constituyen una realización de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente formados usando cualquier procedimiento de entrecruzamiento conveniente. Véase el documento US 4.676.980.

### 1.6 Otras modificaciones

Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos receptores de Fc (FcγR) media las funciones efectoras del anticuerpo que incluyen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fijación del complemento, la fagocitosis y la semivida/eliminación del anticuerpo. Pueden realizarse diversas modificaciones en la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad efectora deseada. En particular, las regiones constantes humanas que carecen esencialmente de las funciones de a) activación del complemento por la ruta clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incluyen la región constante de IgG4, la región constante de IgG2 y regiones constantes de IgG1 que contienen mutaciones específicas tales como por ejemplo mutaciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y/o 322 divulgadas en los documentos EP0307434 (WO8807089), EP 0629 240 (WO9317105) y WO 2004/014953. Se han descrito por separado mutaciones en los residuos 235 o 237 dentro del dominio CH2 de la región constante de cadena pesada (numeración de Kabat; sistema EU Index) para reducir la unión a FcγRI, FcγRII y FcγRIII y por lo tanto reducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Duncan y col. *Nature* 1988, 332; 563-564; Lund y col. *J. Immunol.* 1991, 147; 2657-2662; Chappel y col. *PNAS* 1991, 88; 9036-9040; Burton y Woof, *Adv. Immunol.* 1992, 51; 1-84; Morgan y col., *Immunology* 1995, 86; 319-324; Hezareh y col., *J. Virol.* 2001, 75 (24); 12161-12168). Además, algunos informes también han descrito la implicación de algunos de estos residuos en el reclutamiento o mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Morgan y col., 1995; Xu y col., *Cell. Immunol.* 2000; 200:16-26; Hezareh y col., *J. Virol.* 2001, 75 (24); 12161-12168). Por lo tanto los residuos 235 y 237 se han mutado a residuos de alanina (Brett y col. *Immunology* 1997, 91; 346-353; Bartholomew y col. *Immunology* 1995, 85; 41-48; y documento WO9958679) para reducir tanto los efectos mediados por el complemento como los efectos mediados por FcγR. Los anticuerpos que comprenden estas regiones constantes pueden denominarse anticuerpos "no líticos".

Se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de recuperación en el anticuerpo para aumentar la semivida en

suero, véase el documento US 5.739.277.

Existen cinco receptores Fcγ humanos reconocidos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y col., (2001) *J. Biol. Chem* 276, 6591-6604 demostraron que un conjunto común de residuos de IgG1 está implicado en la unión a todos los FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de este conjunto común. Un grupo de residuos de IgG1 redujo la unión a todos los FcγR cuando se cambiaron por alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y están agrupados cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Aunque FcγRI utiliza solo el conjunto común de residuos de IgG1 para la unión, FcγRII y FcγRIII interaccionan con residuos distintos además del conjunto común. La alteración de algunos residuos solo redujo la unión a FcγRII (por ejemplo Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes mostraron una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII, pero no afectaron a la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejoraron la unión a FcγRII pero la unión a FcγRIII no se vio afectada). Otras variantes presentaron mejor unión a FcγRII o FcγRIII con reducción en la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-298Ala mejoró la unión a FcγRIII y redujo la unión a FcγRII). En el caso de FcγRIIIa, las mejores variantes de unión de IgG1 tenían sustituciones combinadas de alanina en Ser-298, Glu-333 y Lys-334. Se cree que el receptor FcRn neonatal está implicado en la protección de moléculas de IgG de la degradación y de esta manera en el aumento de la semivida en suero y la transcitosis a través de tejidos (véanse Junghans R.P (1997) *Immunol. Res* 16, 29-57 y Ghetie y col. (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766). Los residuos de IgG1 humana que según se ha determinado interaccionan directamente con FcRn humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435.

El anticuerpo terapéutico de la invención puede incorporar cualquiera de las modificaciones de la región constante anteriores.

En una realización particular, el anticuerpo terapéutico carece esencialmente de las funciones de a) activación del complemento por la ruta clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En una realización más particular, la presente invención proporciona anticuerpos terapéuticos de la invención que tienen uno (o más) de los cambios de residuos indicados con detalle anteriormente para modificar la semivida/eliminación y/o funciones efectoras tales como ADCC y/o citotoxicidad dependientes del complemento y/o de la lisis del complemento.

En otro aspecto de la presente invención el anticuerpo terapéutico tiene una región constante de IgG1 de isotipo humano con sustituciones de alanina (u otras alteraciones) en las posiciones 235 (por ejemplo, L235A) y 237 (por ejemplo, G237A) (numeración de acuerdo con el esquema EU indicado en Kabat).

Otros derivados de la invención incluyen variantes de glucosilación de los anticuerpos de la invención. Se sabe que la glucosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes tiene un profundo efecto sobre la función de los anticuerpos, particularmente sobre las funciones efectoras tales como las descritas anteriormente, véase, por ejemplo, Boyd y col. (1996), *Mol. Immunol.* 32, 1311-1318. Se contemplan variantes de glucosilación de los anticuerpos terapéuticos de la presente invención en las que se añaden, sustituyen, suprimen o modifican uno o más residuos de carbohidrato. La introducción de un resto de asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina crea un sitio potencial para la unión enzimática de residuos de carbohidrato y por lo tanto puede usarse para manipular la glucosilación de un anticuerpo. En Raju y col. (2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876, la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG se aumentó a través de un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa-2,3-sialiltransferasa. Se cree que el aumento de la sialilación terminal aumenta la semivida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, de la misma manera que la mayoría de las glicoproteínas, típicamente se producen en la naturaleza como una mezcla de glucoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente en células de mamífero. Se han creado varios procedimientos para fabricar glucoformas definidas, véanse Zhang y col. *Science* (2004), 303, 371, Sears y col., *Science*, (2001) 291, 2344, Wacker y col. (2002) *Science*, 298 1790, Davis y col. (2002) *Chem. Rev.* 102, 579, Hang y col. (2001) *Acc. Chem. Res* 34, 727. De esta manera la invención se refiere a una pluralidad de anticuerpos terapéuticos (que pueden ser de isotipo de IgG, por ejemplo IgG1) como se describen en este documento que comprenden un número definido (por ejemplo, 7 o menos, por ejemplo 5 o menos, tal como dos o una única) de glucoforma(s) de dichos anticuerpos.

Los derivados de acuerdo con la invención también incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención acoplados a un polímero no proteico tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para aumentar la semivida de las proteínas, así como para reducir la antigenicidad y la inmunogenicidad de las proteínas. Se ha investigado el uso de la PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineales o ramificados) con anticuerpos intactos así como con fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. y col. (2000) *Int. J. Pharmaceut.* 198: 83-95. Una realización particular comprende un fragmento de unión a antígeno de la invención sin las funciones efectoras de a) activación del complemento por la ruta clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; (tal como un fragmento Fab o un scFv) acoplada a PEG.

## 2. Procedimientos de producción

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock y col. (1999), *J. Immunol. Methods* 231: 147-157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20: 1-

55), ratones (véase Pollock y col. *ibid*) o plantas (véanse Doran PM, (2000) Curr. Opin. Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat. Med. 4; 601-606, Baez J y col., BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E y col.; (2000) Plant Mol. Biol. 42: 583-590). También pueden producirse anticuerpos por síntesis química. Sin embargo, los anticuerpos de la invención se producen típicamente usando la tecnología de cultivo de células recombinantes bien conocida para los expertos en la materia. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para la propagación adicional o expresión en una célula huésped. Un sistema de expresión útil es un sistema de glutamato sintetasa (tal como el comercializado por Lonza Biologics), particularmente cuando la célula huésped es CHO o NSO (véase más adelante). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas oligonucleotídicas). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones y minicromosomas, de los que son una realización típica los plásmidos. Generalmente tales vectores incluyen además una secuencia señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operativamente al polinucleótido de cadena ligera y/o pesada para facilitar la expresión. El polinucleótido que codifica las cadenas ligera y pesada puede insertarse en vectores separados e introducirse (por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula huésped al mismo tiempo o secuencialmente o, si se desea tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector antes de dicha introducción.

Inmediatamente será evidente para los expertos en la materia que debido a la redundancia del código genético, también están disponibles polinucleótidos alternativos a los divulgados en este documento que codifican los polipéptidos de la invención.

### 2.1 Secuencias señal

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse como una proteína de fusión con una secuencia señal heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura. La secuencia señal debe reconocerse y procesarse por la célula huésped. Para células huésped procariotas, la secuencia señal puede ser una fosfatasa alcalina, penicilinasas o secuencias líder de enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, las secuencias señal pueden ser una secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder del factor o secuencias líderes de fosfatasa ácida, véase por ejemplo el documento WO90/13646. En sistemas celulares de mamíferos, están disponibles secuencias líderes de secreción virales tales como la secuencia señal de gD del virus herpes simplex y las secuencias señal de inmunoglobulinas nativas (tales como cadena pesada de Ig humana). Típicamente la secuencia señal está unida en la misma fase de lectura al polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención.

### 2.2 Origen de replicación

Los orígenes de replicación se conocen bien en la técnica con el de pBR322 adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, con el del plásmido 2 $\mu$  para la mayoría de las levaduras y con diversos orígenes virales tales como el de SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamíferos. Generalmente para vectores de expresión de mamífero integrados no se necesita el componente del origen de replicación de SV40. Sin embargo, el ori de SV40 puede incluirse dado que contiene el promotor temprano.

### 2.3 Marcador de selección

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes no disponibles en los medios complejos o (c) combinaciones de las dos. El esquema de selección puede implicar detener el crecimiento de las células huésped que no contienen el vector o los vectores. Las células, que se han transformado satisfactoriamente con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención, sobreviven debido a por ejemplo resistencia a fármacos conferida por el marcador de selección administrado conjuntamente. Un ejemplo es el sistema de selección de DHFR en el que los transformantes se generan en cepas de huésped negativas para DHFR (por ejemplo, véase Page y Sydenham 1991 Biotechnology 9: 64-68). En este sistema, el gen de DHFR se administra conjuntamente con las secuencias del polinucleótido de anticuerpo de la invención y las células positivas para DHFR después se seleccionan por retirada de nucleósidos del medio. Si es necesario, también se emplea el inhibidor de DHFR metotrexato para seleccionar los transformantes con amplificación del gen de la DHFR. Por medio de la unión operativa del gen de DHFR a las secuencias codificantes de anticuerpos de la invención o derivados funcionales de las mismas, la amplificación del gen de la DHFR produce la amplificación concomitante de las secuencias de anticuerpo deseadas de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para esta selección con DHFR/metotrexato y en la técnica están bien establecidos procedimientos de amplificación y selección de células huésped usando el sistema DHFR, véase Kaufman R.J. y col. J. Mol. Biol. (1982) 159, 601-621, para revisión, véase Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8): 870-80, agosto de 1998. Otro ejemplo es el sistema de expresión de glutamato sintetasa (Bebbington y col. Biotechnology 1992 Vol. 10 p. 169). Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1*; véase Stinchcomb y col. Nature 282, 38, 1979.

## 2.4 Promotores

Los promotores adecuados para la expresión de anticuerpos de la invención se unen operativamente al ADN/polinucleótido que codifica el anticuerpo. Los promotores para hospedadores procariontes incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de Beta-lactamasa y de lactosa, fosfatasa alcalina, triptófano y promotores híbridos tales como *Tac*. Los promotores adecuados para la expresión en células de levadura incluyen los de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucocinasa. Los promotores de levadura inducibles incluyen los del alcohol deshidrogenasa 2, del isocitocromo C, de la fosfatasa ácida, de la metalotioneína y de enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o de la utilización de maltosa/galactosa. Los promotores para la expresión en sistemas celulares de mamífero incluyen promotores de la ARN polimerasa II incluyendo promotores virales tales como el promotor de polioma, de virus de la viruela aviar y de adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), de virus del papiloma bovino, de virus del sarcoma aviar, de citomegalovirus (en particular el promotor del gen temprano inmediato), de retrovirus, de virus de la hepatitis B, de actina, de virus del sarcoma de Rous (RSV) y el promotor temprano o tardío del virus de simio 40 y promotores no virales tales como EF-1alfa (Mizushima y Nagata *Nucleic Acids Res* 1990 18(17): 5322). La elección del promotor puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

## 2.5 Elemento potenciador

Cuando sea apropiado, por ejemplo para la expresión en eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en lugar de o además de los que se encuentran localizados en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamífero adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotioneína e insulina. Como alternativa, se puede usar un elemento potenciador de un virus de célula eucariota tal como el potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, potenciador de polioma, potenciador de baculovirus o locus IgG2a murino (véase el documento WO04/009823). Aunque estos potenciadores típicamente se localizan en el vector en un sitio cadena arriba del promotor, también pueden localizarse en otros sitios, por ejemplo dentro de la región no traducida o cadena abajo de la señal de poliadenilación. La elección y posicionamiento del potenciador pueden basarse en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

## 2.6 Poliadenilación/terminación

En sistemas eucariotas, hay señales de poliadenilación unidas operativamente al polinucleótido que codifica el anticuerpo de esta invención. Tales señales típicamente se ponen en posición 3' de la fase de lectura abierta. En sistemas de mamífero, las señales ejemplares no limitantes incluyen las procedentes de hormonas de crecimiento, factor de elongación-1 alfa y genes virales (por ejemplo de SV40) o repeticiones terminales largas retrovirales. En sistemas de levadura los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de los genes de la fosfoglicerato cinasa (PGK) y la alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En un sistema procarionte típicamente no se requieren las señales de poliadenilación y en su lugar es habitual emplear secuencias terminadoras más cortas y más definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

## 2.7 Otros procedimientos/elementos para mejorar el rendimiento

Además de lo anterior, otras características que pueden emplearse para mejorar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, intrones y modificación de codones específicos para la célula huésped. El uso de codones del anticuerpo de esta invención puede modificarse para adaptar la desviación de codones de la célula huésped tal como para aumentar la transcripción y/o el rendimiento de producto (por ejemplo Hoekema A y col. *Mol Cell Biol* 1987 7(8): 2914-24). La elección de los codones puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

## 2.8 Células huésped

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de los vectores que codifican los anticuerpos de la invención son células procariontes, levaduras o células eucariotas superiores. Las células procariontes adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli* (por ejemplo ATCC 31.446; 31.537; 27.325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase el documento DD 266 710), Pseudomonas tales como *P.aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células huésped de levaduras, también se contemplan *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, ATCC 16.045; 12.424; 24178; 56.500), *Yarrowia* (documento EP402. 226), *Pichia pastoris* (documento EP183. 070, véase también Peng y col. *J. Biotechnol.* 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (documento EP244. 234), *Penicillin*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Aunque la invención contempla específicamente células huésped procariontes y de levadura, sin embargo, típicamente, las células huésped de la presente invención son células de vertebrados. Las células huésped de

vertebrados adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC N.º: CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano 293, PerC6 (Crucell), células renales de cría de hámster (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC N.º: CRL 10314), 293 (ATCC N.º: CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo CHO-K1, ATCC N.º: CCL 61, línea celular de CHO deficiente en DHFR tal como DG44 (Urlaub y col., Somat Cell Mol Genet (1986) Vol. 12 páginas 555-566), particularmente las líneas de células CHO adaptadas para cultivo en suspensión, células de sertoli de ratón, células de riñón de mono, células renales de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón canino (ATCC CCL 34), células de pulmón humano (ATCC CCL 75), células Hep G2 y células de mieloma o linfoma por ejemplo NSO (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

De esta manera en una realización de la invención se proporciona una célula huésped transformada de manera estable que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico como se ha descrito en este documento. Típicamente, tales células huésped comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Tales células huésped también pueden manipularse adicionalmente o adaptarse para modificar la calidad, función y/o rendimiento del anticuerpo de esta invención. Los ejemplos no limitantes incluyen la expresión de enzimas específicas de modificación (por ejemplo, glucosilación) y chaperonas de plegamiento de proteínas.

## 2.9 Procedimientos de cultivo celular

Las células huésped transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos de la invención pueden cultivarse por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia. Las células huésped pueden cultivarse en matraces rotativos, matraces de agitación, matraces cilíndricos, reactores de agitación por ondas (por ejemplo, System 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibras huecas pero para la producción a gran escala se prefiere usar reactores de depósito agitado o reactores de bolsa (por ejemplo, Wave Biotech, Somerset, Nueva Jersey EE.UU.) particularmente para cultivos en suspensión. Típicamente, los depósitos agitados están adaptados para la aireación usando por ejemplo rociadores, compuertas o propulsores de bajo cizallamiento. Para las columnas de burbujeo y reactores con dispositivo de elevación de aire puede usarse la aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células huésped se cultivan en un medio de cultivo sin suero este puede complementarse con un agente protector de células tal como plurónico F-68 para ayudar a prevenir las lesiones celulares como resultado del procedimiento de aireación. Dependiendo de las características de la célula huésped, bien pueden usarse microsoportes como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes de unión o bien las células pueden adaptarse a cultivos en suspensión (lo que es típico). El cultivo de las células huésped, particularmente células huésped de vertebrados puede utilizar una diversidad de modos de operación tales como un procesamiento discontinuo, semicontinuo, discontinuo repetido (véase Drapeau y col. (1994) Cytotechnology 15: 103-109), un procedimiento discontinuo prolongado o un cultivo de perfusión. Aunque las células huésped de mamífero transformadas de manera recombinante pueden cultivarse en medios que contienen suero tales como medios que comprenden suero fetal bovino (FCS), se prefiere que tales células huésped se cultiven en medios libres de suero tales como los descritos en Keen y col. (1995) Cytotechnology 17: 153-163, o medios disponibles en el mercado tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, EE.UU.), suplementado cuando es necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo libre de suero de las células huésped puede requerir que esas células se adapten al crecimiento en condiciones libres de suero. Una estrategia de adaptación es cultivar dichas células huésped en medios que contienen suero y cambiar repetidamente el 80% del medio de cultivo por los medios libres de suero de manera que las células huésped aprendan a adaptarse a las condiciones libres de suero (véase, por ejemplo, Scharfenberg K y col. (1995) en *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. y col. eds), páginas 619-623, Kluwer Academic publishers).

Los anticuerpos de la invención secretados en los medios pueden recuperarse y purificarse a partir de los medios usando una diversidad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso para el que están destinados. Por ejemplo el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos típicamente exige una pureza de al menos el 95% determinada por SDS-PAGE reductora, más típicamente una pureza del 98% o el 99%, en comparación con los medios de cultivo que comprenden los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, los desechos celulares de los medios de cultivo típicamente se retiran usando centrifugación seguida de una etapa de aclarado del sobrenadante usando por ejemplo microfiltración, ultrafiltración y/o filtración en profundidad. Como alternativa, el anticuerpo puede recogerse por microfiltración, ultrafiltración o filtración en profundidad sin centrifugación anterior. Se dispone de una diversidad de técnicas distintas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como cromatografía en hidroxapatita (HA), cromatografía de afinidad (que implica opcionalmente un sistema de señalización de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el documento US 5.429.746). En una realización, los anticuerpos de la invención, después de diversas etapas de aclarado, se capturan usando cromatografía de afinidad de Proteína A o G seguida de etapas de cromatografía adicionales tales como cromatografía de intercambio iónico y/o HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía por exclusión de tamaño y precipitación con sulfato de amonio. Típicamente, también se emplean diversas etapas de eliminación de virus (por ejemplo, nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (típicamente monoclonal) que comprende al menos 10 mg/ml o más, por ejemplo 100 mg/ml o

más del anticuerpo de la invención y por lo tanto constituye una realización de la invención. Puede generarse una concentración de 100 mg/ml o superior por ultracentrifugación. Convenientemente tales preparaciones carecen sustancialmente de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

- 5 Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpos. Estos fragmentos se localizan dentro de la célula o dentro del periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles pueden extraerse y replegarse para formar proteínas activas de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia, véanse Sánchez y col. (1999) J. Biotechnol. 72, 13-20 y Cupit PM y col. (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

### 3. Composiciones farmacéuticas

- 10 Las preparaciones purificadas de anticuerpos de la invención (particularmente anticuerpos monoclonales) como se describen anteriormente, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos tales como los indicados anteriormente. Típicamente tales composiciones además comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir inerte) conocido y requerido por la práctica farmacéutica aceptable, véase por ejemplo Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16<sup>a</sup> ed, (1980), Mack Publishing Co. Los ejemplos de tales vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponados con tampones adecuados tales como acetato sódico trihidrato a un pH farmacéuticamente aceptable, tal como un pH dentro de un intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas para inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal) o infusión continua convenientemente están libres de materia en partículas visibles y pueden comprender de 1 mg a 15 10 g de anticuerpo terapéutico, típicamente de 5 mg a 1 g, más específicamente de 5 mg a 25 mg o 50 mg de anticuerpo. Los procedimientos para la preparación de tales composiciones farmacéuticas son bien conocidos para los expertos en la materia. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden de 1 mg a 10 g de los anticuerpos terapéuticos de la invención en forma de dosificación unitaria, opcionalmente junto con instrucciones de uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden liofilizarse (secarse por congelación) para reconstituirse antes de la administración de acuerdo con procedimientos bien conocidos o evidentes para los expertos en la materia. Cuando las realizaciones de la invención comprenden anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, a la composición farmacéutica se le puede añadir un quelante de iones metálicos que incluye cobre, tal como citrato (por ejemplo citrato sódico) o EDTA o histidina, para reducir el grado de degradación mediada por metal de anticuerpos de este isotipo, véase el documento EP0612251. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender un solubilizante tal como una base de arginina, un agente detergente/anti-agregación tal como 20 polisorbato 80 y un gas inerte tal como nitrógeno para reemplazar el oxígeno del espacio superior del vial.

- Las dosis eficaces y los regímenes de tratamiento para administrar el anticuerpo de la invención generalmente se determinan empíricamente y dependen de factores tales como la edad, el peso y el estado de salud del paciente y la enfermedad o el trastorno a tratar. Tales factores están dentro del ámbito del médico a cargo del caso. Puede encontrarse una guía para la selección de las dosis apropiadas en por ejemplo, Smith y col. (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, Nueva York, pero en general será de 1 mg a 10 g. En una realización, el régimen de dosificación para el tratamiento de un paciente humano es de 1 mg a 1 g del anticuerpo terapéutico de la invención administrado por vía subcutánea una vez a la semana o cada dos semanas, o por infusión intravenosa cada 1 o 2 meses. Esta dosificación corresponde a 0,014-140 mg/kg, tal como 0,014-14 mg/kg. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse profilácticamente.

### 4. Usos clínicos

- Se apreciará que las enfermedades caracterizadas por una niveles elevados de  $\beta$ -amiloide o por depósitos de  $\beta$ -amiloide incluyen la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con  $\beta$ -amiloidosis de tipo Dutch, angiopatía  $\beta$ -amiloide cerebral y diversos tipos de demencias degenerativas tales como las asociadas con la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, degeneración basal cortical y enfermedad de Alzheimer del tipo de cuerpos de Lewy difusos.

Más preferiblemente, la enfermedad caracterizada por una elevación de los niveles de  $\beta$ -amiloide o depósitos de  $\beta$ -amiloide es la enfermedad de Alzheimer.

- 50 Aunque la presente invención se ha descrito principalmente en relación al tratamiento de enfermedades o trastornos humanos, la presente invención también puede tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades o trastornos similares en mamíferos no humanos.

### Ejemplos

#### Procedimientos

- 55 Biacore<sup>TM</sup>/Biacore 3000 un dispositivo que permite la medida de cinéticas en tiempo real de interacciones moleculares usando SPR

SPR (resonancia de plasmón superficial) – fenómeno físico empleado por los instrumentos Biacore<sup>TM</sup> para medir

los cambios de masa en un chip de detección

CM5 chip de detección Biacore™ con una superficie de propósitos generales recubierta con una matriz de dextrano carboximetilado

ELISA ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

- 5 SRU Tecnología de biosensor SRU BIND™ que permite controlar las intreracciones bioquímicas libres de marcador

Integra CL1000 Mini-biorreactores vendidos por IBS Integra Biosciences

FMAT Tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (Applied Biosystems)

ABi8200 Sistema de detección celular confocal macro de fluorescencia de Applied Biosystems 8200 para FMAT

- 10 FPLC Cromatografía líquida de proteína rápida

ProSepA HiTrap Columnas de Proteína A para FPLC vendidas por GE Healthcare

**Materiales**

DMSO dimetilsulfóxido

HEPES N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico)

- 15 EDTA ácido etilendiaminatetraacético

Tris HCl - clorhidrato de tris-(hidroximetil)aminometano

NaCl - cloruro sódico

Tween-20 - monolaurato de polioxietilensorbitano

BSA - seroalbúmina bovina

- 20 PBS - solución salina tamponada con fosfato

PFA - paraformaldehído

IMS - licor metilado industrial

DAB - 3,3'diaminobencidina

DMEM medio de Eagle modificado por Dulbecco

- 25 FCS suero bovino fetal

Opti-MEM medio basado en el medio de Eagle modificado de Invitrogen/Gibco

Lipofectamina agente de transfección de células basado en lípidos catiónicos vendido por Invitrogen/Gibco

Transfast agente de transfección liposomal vendido por Promega

Versene agente quelante de iones metálicos (ácido etilendiaminatetraacético)

- 30 Glutamax forma estable de glutamina añadida al medio de cultivo (complemento dipeptídico L-Ananil-L-Glutamina)

Histoclear agente de aclaramiento de tejidos

tampón HBS-EP Tampón Biacore™ para propósitos generales que contiene HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005%

- 35 **Generación de anticuerpo monoclonal 2E7 de ratón**

El anticuerpo monoclonal 2E7 de ratón se generó a partir de una inmunización convencional de ratones. Se inmunizaron ratones con  $\beta$ -amiloides 1-40 y 1-42 soluble o agregado, formulado en adyuvante de Freund. Después del refuerzo final sin adyuvante, los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma. Las células fusionadas se dejaron crecer en placas de 96 pocillos, en las que los sobrenadantes de los hibridomas se sometieron a una investigación para encontrar posibles indicios. El anticuerpo seleccionado 2E7, que se obtuvo por inmunización con  $\beta$ -amiloides 1-40 soluble, era de isotipo IgG2a murino y tenía actividad de unión a beta-amiloides en el ensayo de flujo

- 40

de salida descrito más adelante y una afinidad de 36,1 pM para el beta-amiloide 1-40 medida por Biacore™, Procedimiento A(i) (Tabla 10A).

### Mapeo de epítopes de 2E7

5 Para mapear finalmente la unión del anticuerpo 2E7 al péptido  $\beta$ -amiloide, se utilizó un conjunto de péptidos (A). El conjunto de péptidos (A) consistía en un conjunto de 31 péptidos solapantes de 12 aminoácidos que cubrían la secuencia completa del péptido  $\beta$ -amiloide 1-42. Cada péptido secuencial se inició en el aminoácido secuencial dentro del péptido  $\beta$ -amiloide, cambiando de esta manera la secuencia cubierta entre péptidos secuenciales por un solo aminoácido. Todos los péptidos del conjunto (A) contenían un engarce C-terminal de 3 aminoácidos (glicina-serina-glicina) y un residuo de lisina biotinilado terminal. Además, todos los péptidos salvo el péptido A $\beta$ 1  
10 DAEFRHDSGYEVGSGK-biotina (SEC ID N.º: 15) estaban acetilados en el extremo N-terminal. Un segundo conjunto de péptidos (conjunto (B)) consistía en deleciones secuenciales C-terminales de un aminoácido de un péptido que contenía los aminoácidos 1 a 10 de la secuencia de  $\beta$ -amiloide. Todos los péptidos del conjunto (B) contenían un engarce C-terminal de 3 aminoácidos (glicina-serina-glicina) y un residuo de lisina biotinilado terminal, pero con residuos adicionales de glicina y serina para reemplazar los aminoácidos de  $\beta$ -amiloide delecionados (Tabla 2). De  
15 esta manera, todos los péptidos del conjunto (B) tienen la misma longitud.

**Tabla 2**

Secuencias de péptidos biotinilados (conjunto (B)) que contenían fragmentos N-terminales truncados de  $\beta$ -amiloide

	DAEFRHDSGYGSGGSK-biotina (SEC ID N.º: 7)
	DAEFRHDSG--GSGGSK-biotina (SEC ID N.º: 8)
20	DAEFRHDS--GSGGSGGK-biotina (SEC ID N.º: 9)
	DAEFRHD--GSGGSGGSK-biotina (SEC ID N.º: 10)
	DAEFRH--GSGGSGGSGK-biotina (SEC ID N.º: 11)
	DAEFR--GSGGSGGSGSK-biotina (SEC ID N.º: 12)
	DAEF--GSGGSGGSGGSK-biotina (SEC ID N.º: 13)
25	DAE--GSGGSGGSGGSGK-biotina (SEC ID N.º: 14)

### Control de la unión de 2E7 a péptidos derivados de $\beta$ -amiloide usando biosensores ópticos

Se lavaron placas revestidas con estreptavidina SRU Bind™ de 96 pocillos (SRU Biosystems) con PBS que contenía DMSO al 1% para retirar el glicerol y el conservante. Se dejó un volumen de 50 ul/pocillo a temperatura ambiente para proporcionar un valor basal constante. Los péptidos biotinilados se diluyeron a aproximadamente 0,3 ug/ml en  
30 PBS que contenía DMSO al 1%, se añadieron 50 ul de cada uno a los pocillos y se incubaron durante aproximadamente 1 h. Se prepararon pocillos por duplicado usando diferentes sectores de la placa y se usó al menos un pocillo de control sin péptido en cada sector para restar la referencia de los datos. Después de la captura de los péptidos la placa se lavó con PBS que contenía DMSO al 1%, dejando 50 ul de tampón reciente por pocillo para proporcionar un nuevo valor basal en el lector. No se observó ninguna descomposición del péptido de la superficie. El tampón después se reemplazó con 40 ul/pocillo de tampón que contenía anticuerpo de ensayo a una  
35 concentración 20-64 nM durante 2 horas. Se descubrió que el anticuerpo 2E7 solo se unía al péptido que incluía los aminoácidos 1-12 del péptido  $\beta$ -amiloide en el conjunto de péptidos (A) (péptido A $\beta$ 1, SEC ID N.º: 15). Este resultado implica que el ácido aspártico en el residuo 1 es crítico para la unión a este péptido.

40 Para caracterizar adicionalmente el sitio de unión del anticuerpo 2E7, se utilizó el conjunto de péptidos (B). Usando la metodología del biosensor SRU BIND™, el anticuerpo 2E7 mostró una unión insignificante a los péptidos que incluían los aminoácidos 1-3 y 1-4 del péptido  $\beta$ -amiloide (SEC ID N.º: 14 y 13). La unión a un péptido que incluía los aminoácidos 1-7 del péptido  $\beta$ -amiloide (SEC ID N.º: 10) fue comparable a la del péptido que incluía los aminoácidos 1-12 del péptido  $\beta$ -amiloide (del conjunto de péptidos (A)). Se observó la unión a péptidos que incluían los aminoácidos 1-5 o 1-6 del péptido  $\beta$ -amiloide (SEC ID N.º: 12 u 11), pero fue más débil (medida por la estabilidad  
45 después de una etapa de lavado adicional) que la unión al péptido que incluía los aminoácidos 1-7 del péptido  $\beta$ -amiloide (SEC ID N.º: 10).

De esta manera, se ha demostrado que solo se requieren los residuos 1-7 del péptido  $\beta$ -amiloide para la unión total medida usando esta metodología.

### Ensayo de resonancia de plasmón superficial

50 Además de los experimentos descritos anteriormente, se usó el biosensor óptico Biacore™ 3000 para controlar la unión del anticuerpo 2E7 a péptidos derivados de la secuencia de  $\beta$ -amiloide seleccionados. La unión se midió

inyectando anticuerpos de ensayo a una concentración de hasta 64 nM durante 5 minutos sobre los péptidos capturados en distintas superficies de chips de estreptavidina (130-230 RU (unidades de resonancia)). Se usó un tampón de procesamiento (HBS-EP) que contenía HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y Tensioactivo P20™ al 0,005% a 25°C a un caudal de 20 ul/min. Todos los ensayos utilizaron una doble referencia frente a una superficie blanco de estreptavidina e inyecciones blanco. El análisis se realizó usando el software de análisis Biacore™ BIAevaluation™ versión 4.1. Los resultados de los péptidos seleccionados del conjunto (A) confirmaron adicionalmente los datos obtenidos con SRU BIND™ indicando que 2E7 se unía únicamente al péptido que incluía los aminoácidos 1-12 (SEC ID N.º: 15) del péptido β-amiloide con una constante de equilibrio aparente KD de aproximadamente 50 pM. En las mismas condiciones, 2E7 no se unía al péptido que incluía los aminoácidos 2-13 del péptido β-amiloide.

#### **Péptido Aβ2-13 AEFRHDSGYEVHGSGK-biotina (SEC ID N.º: 44)**

El procedimiento experimental y las condiciones usadas permitieron la detección de moléculas de alta afinidad, pero también de moléculas de menor afinidad –en el mismo sistema experimental, a diferencia de lo que ocurría con 2E7, se mostró que otro anticuerpo que reconocía un epítipo N-terminal del péptido β-amiloide se unía al péptido 2-13 (SEC ID N.º: 44) con una KD aparente de 7 nM. 2E7 no se unía a una selección de péptidos del conjunto (A) procedentes de regiones intermedias del péptido β-amiloide. En un experimento aparte el péptido β-amiloide 1-40 se capturó a través de su residuo de ácido aspártico N-terminal que se había biotinilado. Este péptido se capturó en un chip recubierto con estreptavidina Biacore™ como se ha descrito previamente. El anticuerpo 2E7 inyectado a una concentración 66 nM durante 1 minuto no pudo unirse a este péptido. Por lo tanto, se concluye que el sitio de unión N-terminal descrito previamente se enmascaraba por el engarce y el procedimiento de captura, confirmando así adicionalmente que el extremo N-terminal contiene el sitio de unión al núcleo.

#### **Unión a la proteína precursora de amiloide (APP) expresada en células**

El β-amiloide está compuesto por péptidos formados por la escisión proteolítica de una proteína precursora transmembrana de tipo I denominada proteína precursora de amiloide (APP). Como APP tiene un dominio extracelular grande, la unión a esta proteína podría iniciar potencialmente una reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Para caracterizar la unión de un anticuerpo a la APP de longitud completa de la superficie celular, se utilizó un ensayo F-MAT™ basado en ABI8200.

#### **Transfección de células HEK293T con ADN de APP de tipo silvestre**

Se mantienen células HEK293T en medio DMEM F12 que contiene FCS al 10% (v/v) y Glutamax 1x. Las células se siembran en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm<sup>2</sup> y se dejan crecer hasta una confluencia de 60-80% (18-24 h) antes de la transfección. Para la transfección, se mezclan 9 µg de ADN (ADN de APP de tipo silvestre (en el vector pCDNA3.1 (Invitrogen)), o vector solo en los controles) con 0,3 ml de medios Opti-MEM™. Se mezclan 30 µl de agente de transfección Lipofectamine™ con 0,3 ml de medios Opti-MEM™ y se reúnen las dos mezclas. Las mezclas reunidas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la adición de 4,8 ml más de medio Opti-MEM™. La mezcla final se añade a las células después de lavar con medios Opti-MEM™ durante 5 h y después se añaden 6 ml de suero de ternero recién nacido al 10% (v/v) en DMEM. 48 horas después de la transfección, se retira el sobrenadante, la monocapa se lava en Versene y después se añaden 3 ml de agente quelante Versene™ a cada matraz, se incuban durante 5 minutos a 37°C y las células separadas se centrifugan a 200 g durante 5 minutos. El sedimento celular resultante se resuspende suavemente en 1 ml de tampón de ensayo (suero tratado con calor al 2%, BSA al 0,5%, NaN<sub>3</sub> al 0,1% en PBS pH 7,4, filtrado a través de un filtro de 0,2 µm) para crear una suspensión de una sola célula.

#### **Ensayo basado en ABI8200 F-MAT™**

Se diluyeron anticuerpos de ensayo (2E7, IgG de ratón LN27 (Zymed) contra el dominio extracelular de APP como un control positivo y un anticuerpo G210 que reconoce la forma x-40 del péptido β-amiloide como un control negativo) a 10 µg/ml en tampón de ensayo filtrado de forma estéril (suero tratado con calor al 2%, BSA al 0,5%, NaN<sub>3</sub> al 0,1% en PBS pH 7,2) en una placa de polipropileno y después se realizaron seis diluciones adicionales seriadas 1:1 en la placa. Como blanco se usó únicamente tampón de ensayo. A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se le añadieron 50 µl de una suspensión de células HEK293T transfectadas con ADN de APP de tipo silvestre (Experimento 1: 10.000 células; Experimento 2: 20.000 células), a la que se añadieron 5 ul de cada una de las soluciones de anticuerpo a pocillos por duplicado. Después se añadieron a cada pocillo 50 ul/pocillo de solución madre de IgG anti-ratón F-MAT™ azul, (el anticuerpo se marca usando el colorante reactivo monofuncional azul F-MAT™ de ABI, 4328408), diluida 1:500 (Experimento 1) y 1:1000 (Experimento 2) en tampón de ensayo y la placa se agitó brevemente y se dejó sedimentar durante 1 hora. La placa después se leyó usando el sistema de detección celular confocal macro de fluorescencia ABI 8200 (Applied Biosystems).

Los datos de recuentos derivados después se interpretaron usando el software de la hoja de cálculo Excel™. Brevemente, los recuentos de las células transfectadas de forma simulada se restaron de los recuentos de células transfectadas con APP de longitud completa para obtener una señal específica para cada anticuerpo. Se eligieron

dos concentraciones de anticuerpo que estaban en la parte lineal de la curva (1,25 y 0,63 ug/ml) y los recuentos derivados corregidos con respecto al efecto de fondo a esas concentraciones se expresaron como el porcentaje de unión al anticuerpo LN27 y se calculó la media para las dos concentraciones de anticuerpo. Los datos resultantes se describen en la Tabla 3 (% de unión a LN27  $\pm$  SE)

- 5 Así, dentro de este sistema de ensayo, la unión de 2E7 a APP de la superficie celular no se puede distinguir de la del anticuerpo de control negativo G210.

**Tabla 3**

Anticuerpo	Experimento 1	Experimento 2
<b>LN27</b>	100,0 $\pm$ 7,1	100,0 $\pm$ 4,7
<b>G210</b>	5,5 $\pm$ 1,3	2,0 $\pm$ 1,6
<b>2E7</b>	9,9 $\pm$ 3,7	2,2 $\pm$ 1,4

#### Unión al péptido derivado de la proteína precursora de amiloide

- 10 Los estudios de mapeo de epítopes descritos anteriormente han demostrado que el anticuerpo 2E7 se une al extremo N-terminal del péptido  $\beta$ -amiloide, con el residuo de ácido aspártico en la posición 1 siendo esencial para la unión. Esto sugiere que el anticuerpo reconoce un epítipo 'neo' formado por la escisión de APP en el sitio de la  $\beta$ -secretasa. Esta observación sugeriría que el anticuerpo 2E7 no debe reconocer la secuencia del péptido APP adyacente. Para ensayar esta hipótesis se sintetizó un péptido APP (Péptido APP1, SEC ID N.º: 16) que incluía los  
15 residuos 1-7 del péptido  $\beta$ -amiloide y los cinco aminoácidos derivados de APP adyacentes. De esta manera, el péptido APP1 contenía aminoácidos contiguos desde la posición 5 N-terminal en el sitio de escisión BACE-1 a la posición 7 C-terminal en el sitio de escisión BACE-1 y estaba acetilado N-terminalmente. La capacidad del anticuerpo 2E7 para unirse al péptido derivado de APP APP1 y el péptido  $\beta$ -amiloide 1-12 (péptido A $\beta$ 1) se comparó usando la metodología Biacore™ (como se ha descrito previamente para el mapeo de epítopes). El anticuerpo 2E7  
20 mostró una alta afinidad de unión al péptido  $\beta$ -amiloide A $\beta$ -1, que contiene el epítipo básico 1-7. Sin embargo, no se observó ninguna unión al péptido APP1 que también contiene la secuencia 1-7 derivada del  $\beta$ -amiloide básico.

Péptido A $\beta$ 1                      DAEFRHDSGYEVGSGK-biotina SEC ID N.º: 15

APP1                                AcNH-SEVKMDAEFRHDGSGK-biotina SEC ID N.º: 16

- 25 Se ha utilizado una combinación de unión celular basada en FMAT™ y mapeo de péptidos basado en Biacore™ para demostrar que, en estos formatos, 2E7 no tiene afinidad de unión por la proteína APP de longitud completa. Dado que el residuo de ácido aspártico en la posición 1 del péptido  $\beta$ -amiloide es requiere para la unión, se concluye que 2E7 solo reconoce el extremo N-terminal 'neo' del péptido  $\beta$ -amiloide y por lo tanto no debería unirse a la APP expresada en la superficie celular.

#### Actividad biológica in vivo

- 30 **Modelo de flujo de salida de I<sup>125</sup>  $\beta$ -amiloide**

- Varios estudios publicados han demostrado que los anticuerpos contra  $\beta$ -amiloide pueden formar complejos con el péptido  $\beta$ -amiloide en la corriente sanguínea. Se argumenta que este secuestro de complejos de  $\beta$ -amiloide periférico facilita además el flujo de salida de amiloide del SNC a la corriente sanguínea (DeMattos RB, PNAS (2001), 98(15); 8850-8855). Se creó un modelo farmacodinámico agudo para rastrear anticuerpos con respecto a su  
35 capacidad de formar complejos con péptido  $\beta$ -amiloide derivado de cerebro en la corriente sanguínea.

- Se indujo anestesia (isoflurano al 4%) en ratones C57/BL6J macho y se mantuvieron (isoflurano al 1,5%) en oxígeno al 100%. Después los animales se pusieron en un marco estereotáxico. Después de una incisión en la línea media a lo largo de la sutura sagital se perforó un orificio a través del cráneo y se insertó una cánula guía en el ventrículo cerebral lateral (coordenadas anteroposterior (AP) -0,5 mm, lateral (L) +0,7 mm, ventral (V) -2,5 mm). Se perforaron  
40 dos orificios más a través del cráneo en los que se pusieron tornillos corticales. La cánula se ancló en su sitio por medio de gel de cianoacrilato y la incisión se suturó alrededor de la tapa de gel de cianoacrilato. Después de la operación, los ratones recibieron 0,3 ml de solución salina por vía subcutánea y se pusieron en un medio caliente para que se recuperaran de la anestesia. Tras la recuperación del reflejo de enderezamiento, los ratones se encerraron individualmente y recibieron cuidados convencionales durante los 5 días siguientes a la operación. No se

5 permitieron procedimientos durante los 5 días posteriores o hasta que se recuperó el peso anterior a la operación. Después de la recuperación, se verificó la colocación de la cánula por la respuesta de ingestión de líquido a la angiotensina II. Cada ratón recibió una administración intracerebroventricular (ICV) (5  $\mu$ l) de 100 ng de angiotensina II (All) (reconstituida en solución salina al 0,9%). Después de la administración de All, se observó la ingesta de agua durante 15 minutos. En los estudios se incluyeron ratones con una respuesta dipsogénica positiva a la All (ingestión de líquido sostenida), que comenzó no antes de cinco días desde la inyección de All.

10 En el día del estudio los ratones se pusieron durante 5-10 minutos en un ambiente cálido para inducir la vasodilatación, necesaria para facilitar la inyección en la vena de la cola. Se inyectó anticuerpo de ensayo (600  $\mu$ g) o vehículo de PBS (con un volumen de dosificación no superior a 10 ml por kg de peso corporal) a través de la vena de la cola y los ratones se devolvieron a sus jaulas individuales después de la inyección. Exactamente una hora después de la inyección en la vena de la cola, en los ratones se inyectó ICV lentamente (2  $\mu$ l por minuto) con 2 ng (1  $\mu$ Ci) de  $^{125}$ I beta-amiloide 1-40 (Amersham Biosciences, Reino Unido) en un volumen de dosificación de 5  $\mu$ l. Exactamente cuatro horas después de la dosis ICV, se recogieron 50  $\mu$ l de sangre del tronco y se midió el nivel de radiactividad en un contador de centelleo.

15 Los ratones que habían recibido inyecciones de 2E7 en la vena de la cola (n = 6 por grupo de tratamiento) mostraron un aumento estadísticamente significativo en la señal radiactiva (cuenta por minuto – CPM) en 50  $\mu$ l de sangre del tronco en comparación con la señal de CPM detectada en los ratones inyectados con vehículo (CPM – vehículo: 1339,7  $\pm$  496,2 frente a 2E7 4387,9  $\pm$  980,3; ANOVA:F(2,13) = 4,97, p < 0,05. Post-hoc LSD: p = 0,01 2E7 frente a vehículo [post-hoc Duncans: p = 0,02 2E7 frente a vehículo]).

20 En dos estudios adicionales con 2E7 realizados con un protocolo idéntico, se observaron aumentos similares en el flujo de salida de amiloide al interior de la sangre en comparación con los controles que habían recibido inyecciones de vehículo (CPM sangre: Vehículo 352  $\pm$  113 frente a 2E7 2397  $\pm$  353 y Vehículo 1281  $\pm$  312 frente a 2E7 5291  $\pm$  885; ANOVA con ensayo post-hoc LSD p < 0,001 frente a vehículo).

### Modelos transgénicos de reducción de $\beta$ -amiloide del SNC

#### 25 1. Carga de $\beta$ -amiloide después de una dosificación de 4 semanas en ratones TASTPM de 2 meses de edad

30 Se encerraron individualmente ratones transgénicos TASTPM macho y hembra (mutantes dobles APP<sup>swe</sup> x PS1.M146V, Howlett DR (2004) Brain Research 1017 (1-2) 130-136) con edades comprendidas entre 61 y 65 días al inicio del estudio. Se asignaron números iguales de ratones a cada grupo de tratamiento (N = 12 por grupo) y se distribuyeron al azar de acuerdo con el sexo y la edad. Los grupos de tratamiento comprendían lo siguiente: A: MOPC21 (anticuerpo con especificidad desconocida, Holton y col (1987) J. Immunol 139(9) 3041-3049, control negativo), B: 2E7 (anticuerpo de ensayo). Todos los anticuerpos se disolvieron en PBS y se administraron por vía intraperitoneal. Independientemente del peso del animal, se administraron 300  $\mu$ g de anticuerpo. Los animales recibieron la dosificación dos veces por semana durante cuatro semanas. Un día después de la dosificación final, los animales se sacrificaron por una sobredosis con pentobarbital sódico. Los cerebros se diseccionaron y se hemiseccionaron. Se recogieron muestras de cerebro hemiseccionado en tubos eppendorf™ de 2 ml pesados previamente y se congelaron instantáneamente. Posteriormente las muestras se descongelaron, se volvieron a pesar y se añadió 1 ml de guanidina HCl 5 M que contenía comprimidos de Complete protease inhibitor™ (Boehringer Mannheim), antes de homogeneizar las muestras y de incubarlas a 4°C durante un periodo > 90 min con agitación constante.

40 Después, las muestras se diluyeron 1 a 10 en tampón de ensayo (Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05% + BSA al 1%), se sometieron a agitación vorticial y se centrifugaron a 20.000 G durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se retiró y se añadió como muestras por triplicado a la placa de ensayo.

45 Los niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 se midieron usando un inmunoensayo electroquimioluminiscente basado en placas sensibles (BioVeris™) empleando anticuerpos contra  $\beta$ -amiloide específicos del extremo C-terminal (contra A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42) marcados con el marcador específico Oritag™ para facilitar la detección (BioVeris™) usados para capturar A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42, junto con un anticuerpo contra A $\beta$  específico del extremo N-terminal biotinilado. Se capturaron complejos de anticuerpo-A $\beta$  con perlas revestidas con estreptavidina que se unen a los anticuerpos biotinilados (Dynabeads™, Dynal) incubadas durante una noche a temperatura ambiente con mezcla vigorosa y se ensayaron en un fotodetector BioVeris™ M8. Se construyeron curvas patrón usando péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 humanos en tampón de ensayo que contenía la concentración requerida de Guanidina HCl. Los datos se analizaron usando software de análisis estadístico Excel Robosage™ y los niveles de A $\beta$  se expresaron como pmol/g de tejido.

50 En este paradigma, el tratamiento con anticuerpo 2E7 redujo la carga de A $\beta$ 42 del SNC en el 37% (p < 0,001) y la carga de A $\beta$ 40 del SNC en el 23% (p < 0,001).

55 En estudios posteriores en condiciones experimentales similares, el anticuerpo 2E7 redujo la carga de A $\beta$ 42 del SNC en el 38% (Estudio 1, solo machos), el 22% (Estudio 2, no significativo) y el 39% (Estudio 3, machos, p = 0,001) y el 13% (Estudio 3, hembras, no significativo) en comparación con los animales tratados con PBS. En estos estudios 2E7 también redujo la carga de A $\beta$ 40 del SNC en el 18% (Estudio 3, machos, p = 0,017) y ofreció una reducción no

significativa en A $\beta$ 40 del SNC en el 25% (Estudio 1, solo machos), < 1% (Estudio 2) y un aumento no significativo del 3% (Estudio 3, hembras) cuando se compararon con los animales tratados con PBS.

## 2. Carga de $\beta$ -amiloide después de una dosificación de 4 meses en ratones TASTPM de 4 meses de edad

5 Brevemente, a ratones transgénicos TASTPM de 4 meses de edad se les administraron 300  $\mu$ g de anticuerpo una o dos veces por semana a través de la vía intraperitoneal (i.p.). Después de 4 meses de dosificación se midieron los niveles de  $\beta$ -amiloide del SNC por ELISA y se midió la carga de placas por inmunohistoquímica. Entre las edades de 4 y 8 meses, la carga de  $\beta$ -amiloide del SNC aumenta exponencialmente y por consiguiente, se desarrolla rápidamente la patología de las placas (Howlett DR (2004) Brain Research 1017 (1-2) 130-136).

10 Se encerraron individualmente ratones con edades comprendidas entre 120 y 128 días al inicio del estudio. Se asignaron números similares de ratones a cada grupo de tratamiento (N = 20 o 21 por grupo) y se distribuyeron al azar de acuerdo con el sexo y la edad. Los grupos de tratamiento comprendían lo siguiente: A: PBS (vehículo) administrado dos veces por semana, B: 2E7 administrado una vez por semana, C: 2E7 administrado dos veces por semana, D: PBS administrado una vez por semana. Se administró una dosis de 300 microgramos (un volumen de 79 microlitros) de 2E7 por medio de la vía intraperitoneal. Los animales tratados con vehículo recibieron el mismo volumen de PBS. Se administró la dosificación a los animales durante dieciocho semanas. Los ratones TASTPM pueden sufrir ataques espontáneos y como resultado varios animales murieron durante el transcurso del estudio. Los números finales fueron los siguientes A: 4 hembras, 9 machos; B: 5 hembras, 8 machos; C: 4 hembras, 9 machos; D: 2 hembras, 9 machos. Dos o cuatro días después de la dosificación final (números iguales por grupo) los animales se sacrificaron por sobredosis con pentobarbital sódico. Se tomó una muestra de la punta de la cola de cada ratón para confirmar el genotipo. Los cerebros se diseccionaron y hemiseccionaron. El hemisferio derecho se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% y se procesó para un análisis histológico. El hemisferio izquierdo se recogió en tubos eppendorf<sup>TM</sup> de 2 ml pesados previamente, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C para un análisis posterior del contenido de amiloide. Antes del análisis, las muestras se descongelaron, se volvieron a pesar y se añadió 1 ml de guanidina HCl 5 M que contenía comprimidos de Complete protease inhibitor<sup>TM</sup> (Boehringer Mannheim), antes de homogeneizar las muestras y de incubarlas a 4°C durante un periodo > 90 min con agitación constante.

Después las muestras se diluyeron 1 a 10 en tampón de ensayo (Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05% + BSA al 1%), se sometieron a agitación vorticial y se centrifugaron a 20.000 G durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron adicionalmente 1:1000 y se añadieron como muestras por triplicado a la placa de ensayo.

Los niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 se midieron de la misma manera que en el estudio de dosificación de 4 semanas.

Se usó un análisis de varianza utilizando como efectos fijados el tratamiento, el sexo y el programa de dosificación incluido en el modelo. También se incluyeron todas las interacciones entre los tres factores. No hubo diferencias significativas entre los dos programas de dosificación (una o dos veces por semana). Con este diseño experimental, en primer lugar pudo evaluarse si había alguna diferencia significativa entre los programas de dosificación y en segundo lugar, como no había ninguna de estas diferencias significativas, los datos de los dos programas de dosificación pudieron combinarse, aumentando de esta manera la potencia del experimento al duplicar el número de ratones en el análisis.

40 En este paradigma, el tratamiento con anticuerpo 2E7 redujo la carga de A $\beta$ 42 del SNC en el 22,5% ( $p = 0,0152$ ). Los niveles de A $\beta$ 40 del SNC también se redujeron en el 12,1%, pero esta figura no alcanzó significado estadístico ( $p = 0,118$ ).

Se realizó un análisis inmunohistoquímico complejo de estas muestras para definir el área de tejido cerebral que mostraba patología de placas. Se tomaron secciones de la corteza al nivel del núcleo caudado y de la corteza al nivel del hipocampo. Se tiñeron las secciones adyacentes bien con un anticuerpo específico para A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42 o bien como alternativa con el tinte de amiloide Rojo Congo. Usando un software de análisis de imágenes, el área de la sección teñida para las placas se expresó como un porcentaje del área de la sección total.

Después de la fijación, se cortaron en corona mitades de los cerebros sumergidas en PFA en una matriz cerebral en secciones de 6 x 2 mm de espesor. Estas secciones de 2 mm se denominarán secciones A a F, siendo A la más rostral y F la más caudal. Las secciones A, B y C y D, E y F se pusieron en casetes de inclusión separados numerados para cada animal. Los casetes se mantuvieron en PFA hasta que estuvieron listos para el procesamiento y la inclusión.

La inclusión se realizó en un procesador de tejidos Citadel<sup>TM</sup> 1000 (Shandon). Todos los tejidos recibieron el siguiente régimen de procesamiento:

55 IMS al 70% – 1 h

IMS al 100% – 3 x 1 h

etanol al 100% – 2 h

alcohol isobutílico al 100% ; 1 x 2 h; 1 x 1,5 h

Histoclear™ – 2 x 1,5 h

Cera de parafina – 2 x 2 h

5 Después de finalizar el ciclo de procesamiento, las secciones de tejido impregnadas con cera se transfirieron a moldes de base rellenos de cera de parafina fundida y se incluyeron utilizando un sistema de inclusión de parafina Histocentre™ (Shandon). El tejido se incluyó de tal forma que las secciones A, B y C entraron en un molde; y las secciones D, E y F en un segundo molde. Esto se hizo para todos los conjuntos de secciones es decir cada cerebro hemiseccionado dio como resultado dos bloques de cera de tres secciones cada uno. Las secciones se pusieron en los moldes de tal forma que la superficie caudal de cada pieza se convirtiera en la superficie de corte futura. Se tuvo cuidado para asegurar que cada sección estaba bien apretada en el molde de forma que cada corte de microtomo tuviera lugar en paralelo. Después el casete de procesamiento perforado se puso cuidadosamente en cada molde, que posteriormente se llenó con cera fundida. Los bloques incluidos después se enfriaron en la placa refrigerada hasta que pudieron extraerse de los moldes. Los bloques se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se requirieron para realizar los cortes con el microtomo. Los bloques se cortaron al azar y se pusieron secciones de 5 micrómetros sobre portaobjetos recubiertos con gelatina marcados previamente (Superfrost™, Erie Scientific Company). Se pusieron dos secciones en cada portaobjetos. Siempre que fue posible, se montaron secciones consecutivas y los portaobjetos se numeraron consecutivamente del 1 al 25. Se tomaron cincuenta secciones (25 portaobjetos) de cada bloque. Los portaobjetos se secaron en una placa caliente y después se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se utilizaron.

El análisis inmunohistoquímico se realizó en conjuntos de 30 portaobjetos. En cada portaobjetos, la sección superior se marcó con un anticuerpo Aβ40 (G30, policlonal de conejo que reconoce x-40 β-amiloide), la sección inferior con el anticuerpo Aβ42, 20G10, anticuerpo monoclonal que reconoce x-42 β-amiloide. Se marcó un mínimo de 5 secciones por anticuerpo y por bloque.

25 El marcaje se realizó como se indica a continuación. Después de retirar la cera por medio de Histoclear y alcoholes graduados, las secciones se sumergieron en ácido fórmico al 85% durante 8 minutos y después se bloquearon en peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 30 minutos para bloquear las peroxidases endógenas. Se aplicaron anticuerpos G30 y 20G10 durante una noche a diluciones 1:1000, dejándose las secciones a 4°C. El revelado de las secciones se realizó con los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón biotinilados respectivos. El revelado de color se realizó con un kit de tinción de tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB™, Vector Labs). Las secciones se tiñeron brevemente con un tinte de contraste de hematoxilina de Mayer antes de hidratarse, aclararse y taparse con un cubreobjetos.

35 Las secciones se dejaron secar durante al menos 48 horas antes de observarse al microscopio. Las imágenes se capturaron en un microscopio Leica DMRB™ equipado con una cámara digital. Las imágenes se analizaron usando el software Qwin™ (Leica) y los resultados se presentaron como porcentaje del área de sección que estaba marcada por el anticuerpo contra Aβ.

40 Se usó un análisis de varianza con tratamiento, sexo y programa de dosificación incluido en el modelo como efectos fijados. También se incluyeron todas las interacciones entre los tres factores. No hubo diferencias significativas entre los dos programas de dosificación (una o dos veces por semana). Con este diseño experimental, en primer lugar se pudo evaluar si había alguna diferencia significativa entre los programas de dosificación y en segundo lugar, como no había ninguna diferencia significativa, los datos de los dos programas de dosificación pudieron combinarse, aumentando de esta manera la potencia del experimento al duplicar el número de ratones en el análisis.

45 En este paradigma, el tratamiento con anticuerpo 2E7 redujo la patología de las placas como se mide con un anticuerpo que reconoce Aβ42. La patología de las placas se redujo en el 27,1% (p = 0,0026) en la corteza al nivel del hipocampo y el 43% (p < 0,0001) en la corteza al nivel del núcleo caudado. La patología de placas también se redujo cuando se midió con un anticuerpo que reconocía a Aβ40. La patología de placas se redujo en el 16,6% (p = 0,0421) en la corteza al nivel del hipocampo y el 17,3% (p = 0,0342) en la corteza al nivel del caudado.

50 No se observó ningún indicio de microhemorragia (determinada por Azul de Prusia de Perls) en ningún ratón en este estudio tratado con vehículo o 2E7. Este procedimiento visualiza el hierro férrico (el hierro es un constituyente esencial de la hemoglobina que lleva el oxígeno presente en los glóbulos rojos) produciendo un compuesto azul insoluble. Todos los niveles de cerebro de todos los animales eran transparentes.

### Modelos de cognición

55 Después de la dosificación durante 4 meses de ratones TASTPM de 4 meses de edad como se ha descrito anteriormente, estos ratones se sometieron a un ensayo en dos modelos de cognición: el ensayo de reconocimiento de objetos y el ensayo de acondicionamiento al miedo.

### Ensayo de reconocimiento de objetos

El ensayo de reconocimiento de objetos aprovecha la tendencia natural de los animales a explorar nuevos objetos y se basa en la capacidad de los animales de reconocer un objeto que han explorado previamente (objeto conocido). Se ha notificado que los ratones TASTPM de ocho meses de edad muestran una deficiencia en la capacidad de distinguir entre objetos nuevos y conocidos (Howlett y col., 2004), lo que indica un rendimiento cognitivo alterado en estos animales. Sin embargo, en este estudio, los ratones TASTPM de 8 meses de edad tratados con vehículo no mostraron un deterioro cognitivo, es decir, pudieron distinguir entre objetos nuevos y conocidos. Por lo tanto, no hubo posibilidad de investigar ningún efecto terapéutico potencial resultante del tratamiento con 2E7.

### Ensayo de acondicionamiento al miedo

El modelo de acondicionamiento al miedo se diseñó para ensayar la capacidad de los animales de correlacionar un estímulo doloroso anterior con una señal contextual o de entrada y reconocerla cuando se presenta con el mismo contexto o señal después de un retraso de x horas. En este estudio los ratones TASTPM de 8 meses de edad tratados con vehículo (una o dos veces por semana) mostraron una deficiencia en la diferenciación contextual indicativa de un deterioro cognitivo en estos animales. Esta deficiencia no se vio afectada por el tratamiento con 2E7 cuando se administró una o dos veces por semana.

### Dosificación durante 4 meses en ratones TASTPM de 6 meses de edad

Este estudio implicó la administración de 2E7 (300 µg i.p. dos veces por semana) a ratones TASTPM durante 4 meses, empezando a los 3 meses de edad. Los animales de control recibieron IgG2A en PBS. Como se ha descrito anteriormente, los cerebros se diseccionaron y hemiseccionaron. El hemisferio derecho se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% y se procesó para la histología. El hemisferio izquierdo se recogió en tubos eppendorf™ de 2 ml pesados previamente, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C para el análisis posterior del contenido de amiloide.

Se realizó un análisis preliminar de una sola sección de cada muestra de una selección aleatoria de muestras de cerebro (n = 6 vehículo, n = 7 grupo tratado con 2E7) por IHC usando el mismo protocolo general que se ha indicado anteriormente. El análisis estadístico (ensayo t de Student) demuestra que hubo una reducción significativa en la carga de placas de Aβ42 en el tálamo (71,9%, p = 0,007) y en el tálamo + corteza + hipocampo (54,1%, p = 0,022) en ratones que recibieron 2E7 pero sin cambios significativos en Aβ40.

Para la medición bioquímica de Aβ40 y Aβ42 en cerebro, las muestras se procesaron y se midieron como se ha indicado anteriormente (factor de dilución 1:10.000). Aβ42 se redujo significativamente (p = 0,01) en el 29,9% en los ratones que recibieron la dosificación de 2E7 (n = 12 control, n = 16 tratados). Las concentraciones de Aβ40 también se redujeron (22,6%), pero esta reducción no pudo alcanzar un significado estadístico (p = 0,052).

### Clonación de regiones variables de hibridoma

#### Secuencias de región variable

Se extrajo el ARN total a partir de células de hibridoma 2E7 y después se generaron secuencias de ADNc del dominio variable de las cadenas pesada y ligera por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El cebador directo para la RT-PCR fue una mezcla de cebadores degenerados específicos para secuencias líder del gen de inmunoglobulina murina y el cebador inverso fue específico para las regiones constantes del anticuerpo, en este caso IgG2a de isotipo murino para la cadena pesada y kappa murina para la cadena ligera. Los cebadores se diseñaron de acuerdo con la estrategia descrita por Jones y Bendig (Bio/Technology 9: 88, 1991). La RT-PCR se realizó por duplicado para las dos secuencias de la región V para permitir la verificación posterior de las secuencias de la región V correctas. Los productos de la región V generados por RT-PCR se clonaron (kit de Invitrogen TA Cloning) y se obtuvieron los datos de secuencia.

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> de 2E7 (SEC ID N.º: 17)

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPRKGPEWIAFISNLAYSIDYADTVTGRFTISRDNANKN  
45 TLYLEMSSLRSEDAMYYCVSGTWFAYWGQGTLVTVSA

Secuencia de ADN de V<sub>H</sub> de 2E7 (SEC ID N.º: 18)

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGTCT  
CTGGATTCACCTTTCAGTGACAACGGAATGGCGTGGGTTTCGACAGGCTCCAAGGAAGGGCCTGAGTGGATAGC  
50 GTTCATTAGTAATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCTAGAGATAA  
TGCCAAGAATACCCTGTACCTGGAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTACTATTGTGTAAGCG  
GGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> de 2E7 (SEC ID N.º: 19)

DVVLQTPLSLPVS LGDQASISCRV SQLLSNGYTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GV PDR FS GS GS GT DF TL

KISRVEAEDLG<sup>V</sup>YFCSQ<sup>R</sup>TRHVPYTFGGGKLEIK

Secuencia de ADN de V<sub>L</sub> de 2E7 (SEC ID N.º: 20)

5 GATGTTGTGCTGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGAGTT  
AGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAG  
CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGA  
TTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCC  
GTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA

En las secuencias de aminoácidos están subrayadas las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR).

**Clonación y expresión de las quimeras de 2E7**

10 Se generó un anticuerpo 2E7 quimérico (2E7c) que consiste en las regiones V murinas parentales injertadas en la IgG1 humana (Fc mutado (L235A, G237A)) para la cadena pesada o regiones C kappa humanas para la cadena ligera para expresar material de anticuerpo recombinante que pudiera usarse para confirmar la clonación correcta de regiones V murinas funcionales. Se clonaron ADN que codificaba regiones V de cadena ligera y de cadena pesada murinas de 2E7 y secuencias señal murinas endógenas en fase en los vectores de expresión de mamíferos RLD-  
15 bshe (para la cadena pesada) y RLN-bshe (para la cadena ligera) que ya contenían regiones constantes humanas (Fc de IgG1 mutado (L235A, G237A) o C kappa humana, respectivamente).

Elementos del vector de expresión RLD-bshe para la expresión de la cadena pesada:

Pares de bases	Descripción del segmento de ADN
0 - 1014	Promotor (SV40/RSV)
1015 - 2442	Cadena pesada de anticuerpo
2443 - 2765	Poli A
2766 - 3142	Promotor de BG
3239 - 3802	DHFR
3803 - 4162	Poli A
4163 - 6322	Cadena principal total
5077 - 5937 (cadena complementaria)	Beta lactamasa

(la posición de los elementos y el tamaño total del vector dado anteriormente solo tienen fines ilustrativos y dependerán del tamaño del inserto de la cadena de anticuerpo)

20 Elementos del vector de expresión RLN-bshe para la expresión de la cadena ligera:

Pares de Bases	Descripción del segmento de ADN
0 - 1014	Promotor (SV40/RSV)
1015 - 1731	Cadena ligera de anticuerpo
1732 - 2051	Poli A
2388 - 2764	Promotor de BG
2774 - 3568	Neomicina
3569 - 3876	Poli A
3877 - 6063	Cadena principal total
5077 - 5937 (cadena complementaria)	Beta lactamasa

(la posición de los elementos y el tamaño total del vector dado anteriormente solo tienen fines ilustrativos y dependerán del tamaño del inserto de la cadena de anticuerpo)

25 Se identificaron clones con las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> clonadas correctamente y se prepararon plásmidos para la expresión en células CHO de cultivo en suspensión. El anticuerpo 2E7c expresado se purificó a partir del sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de proteína A en un sistema FPLC y después se ensayó la unión a

A $\beta$  por ELISA y SPR usando la tecnología Biacore™. Los resultados indicaron que se habían clonado y expresado las regiones V de ratón de 2E7 correctas, dando como resultado un anticuerpo funcional con características similares a las del anticuerpo 2E7 murino parental.

#### Humanización de cadena ligera

- 5 Se seleccionó una secuencia aceptora humana con el Genpept ID CAA51135 (SEC ID N.º: 24) y el N.º de acceso del Genbank X72467, que tenía una identidad del 77% a nivel de los aminoácidos (incluyendo las CDR) como región de armazón aceptora. La construcción L1 es un injerto de las CDR murinas del dominio VL de 2E7 en esta región de armazón aceptora.

#### Humanización de cadena pesada

- 10 Se seleccionó la secuencia humana con el N.º de acceso del Genbank M99675 (SEC ID N.º: 21), un alelo del gen VH3-48 con una identidad del 74% a nivel de aminoácidos (incluyendo las CDR 1 y 2) con la región pesada variable de ratón de 2E7 como región de armazón aceptora de cadena pesada humana junto con el minigén JH4 humano. Se diseñaron tres variantes de cadena pesada variable humanizada basándose en la secuencia de M99675 y JH4. H1 es un injerto de las CDR murinas usando la definición de Kabat con dos retromutaciones adicionales en la región de armazón en las posiciones 93 y 94. H2 y H3 se derivaban ambas de H1, pero incorporaron una mutación de región de armazón adicional que era diferente en cada construcción; (posiciones 24 y 48 respectivamente; véase la Tabla 4).

Tabla 4

Construcción	Regiones de armazón de plantilla	Residuo (Nº de Kabat)	Humano	Ratón
H1	M99675 y JH4	93,94	A y R respectivamente	V y S respectivamente
H2	H1	24	A	V
H3	H1	48	V	I

#### Construcción de ADN de cadena ligera y pesada humanizada

- 20 Se sintetizaron regiones V humanizadas *de novo* por acumulación de oligos solapantes y amplificación por PCR. Se incluyeron sitios de restricción para clonación en vectores de expresión de mamífero RLD-bshe y RLN-bshe y secuencias señal de inmunoglobulina humana derivadas de las regiones de armazónceptoras humana elegidas. Después se clonaron los ADN que codificaban las regiones V humanizadas (H1 (SEC ID N.º: 27), H2 (SEC ID N.º: 29), H3 (SEC ID N.º: 31), L1 (SEC ID N.º: 33)) junto con secuencias señal y sitios de restricción en fase en vectores de expresión de mamífero: H1, H2 y H3 en RLD-bshe para generar ADN que codificaba tres cadenas pesadas mutadas de Fc de IgG1 humana de longitud completa conteniendo cada una mutaciones L235A y G237A, H1 de longitud completa (SEC ID N.º: 35), H2 de longitud completa (SEC ID N.º: 37) y H3 de longitud completa (SEC ID N.º: 39); L1 se clonó en fase en RLN-bshe que contenía el ADN que codificaba la región constante kappa humana para generar ADN que codificaba una cadena ligera kappa humana de longitud completa (SEC ID N.º: 41).

#### 30 Ejemplos representativos de expresión de combinaciones de anticuerpos de cadenas pesadas y ligeras humanizadas

- Se transfectaron de forma transitoria células CHOK1 a pequeña escala con todas las combinaciones de construcciones de ADN de cadenas ligeras y pesadas humanizadas: L1+H1, L1+H2, L1+H3 (SEC ID N.º: 35 + 41, 37 + 41, 39 + 41) en placas de 6 pocillos. Se cultivaron hasta la confluencia células CHOK1 sometidas a pases en DMEM F12, con 5% de suero bovino fetal con un contenido de IgG ultra-bajo y glutamina 2 mM en placas de 6 pocillos. Las células confluentes se transfectaron con un total de 7,5  $\mu$ g de ADN: 30  $\mu$ g de lípido Transfast (Promega) en medio Optimem Glutamax (Invitrogen). Las células transfectadas se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. A las 72 horas, se recogieron los sobrenadantes y se ensayó la concentración de anticuerpo y después se ensayó la unión a A $\beta$  humano por ELISA. La región L1 humanizada combinada con las tres cadenas pesadas humanizadas expresaron el anticuerpo completo que se unía a A $\beta$  humano.

- También se expresaron anticuerpos humanizados en transfecciones de células CHOK1 transitorias a gran escala usando la administración liposomal de ADN (por ejemplo, TransFast (Promega)) y expresión en frascos de cultivo. Para la optimización de los niveles de expresión en transfecciones transitorias, se usó una relación de ADN de vector de expresión entre cadena pesada y cadena ligera de 1:6. El material de la transfección transitoria se purificó usando columnas ProSepA o FPLC con columnas ProSepA HiTrap.

#### 45 Evaluación de variantes humanizadas de 2E7 H1L1, H2L1 y H3 L1 en ELISA de unión a $\beta$ -amiloide

Se evaluaron variantes humanizadas H1L1, H2L1 y H3L1 de 2E7 con respecto a la unión al péptido A $\beta$  humano (1-40) biotinilado en el extremo C-terminal. El 2E7 quimérico se usó como referencia. Las Tablas 5-7 muestran los resultados con diversos lotes de material purificado a partir de las transfecciones transitorias a gran escala.

Tabla 5

ELISA	mAb	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Error Típico
Unión a A $\beta$	Quimera de 2E7c	0,033	0,00144
	H1L1	0,035	0,00142
	H2L1	0,048	0,00202
	H3L1	0,044	0,00105

5

Tabla 6

ELISA	mAb	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Error Típico
Unión a A $\beta$	Quimera de 2E7c	0,043	0,00183
	H1L1	0,051	0,00164
	H2L1	0,044	0,00191
	H3L1	0,055	0,00094

Tabla 7

ELISA	mAb	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Error Típico
Unión a A $\beta$	Quimera de 2E7c	0,044	0,00169
	H1L1	0,047	0,00265
	H2L1	0,041	0,00174
	H3L1	0,040	0,00116

Estos resultados indicaron perfiles de unión a A $\beta$  muy similares para cada una de las variantes humanizadas derivadas de 2E7. La comparación de los valores de CE<sub>50</sub> con el 2E7c mostró una pequeña pérdida de actividad de unión a A $\beta$  que se había producido a lo largo del proceso de humanización.

#### 10 Comparación de variantes humanizadas de 2E7 por ELISA competitivo

Se evaluaron anticuerpos quiméricos y humanizados de 2E7c H1L1, H2L1 y H3L1 con respecto a su capacidad de inhibir la unión entre el péptido A $\beta$  humano y el MAb 2E7 de ratón parental en un ELISA competitivo.

15 Se establecieron dos tipos de ELISA competitivo para comparar la actividad de unión a A $\beta$  de las tres variantes humanizadas en comparación con el anticuerpo quimérico 2E7. 1)  *$\beta$ -amiloide inmovilizado*; Se inmovilizó péptido A $\beta$  (1-40) humano biotinilado a través de estreptavidina en placas ELISA. Se añadió anticuerpo 2E7 de ratón a una concentración constante junto con una serie de diluciones de anticuerpos variantes humanizados derivados de 2E7. Después se detectó el MAb 2E7 de ratón unido con conjugado de IgG anti-ratón. La Tabla 8 muestra los resultados de los dos ensayos.

Tabla 8

MAb competidor	Experimento 1		Experimento 2	
	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Error Típico	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Error Típico
Quimera de 2E7c	1,31	0,20	1,29	0,13
H1L1	1,62	0,40	1,76	0,21
H2L1	1,28	0,26	1,66	0,28
H3L1	1,53	0,16	1,39	0,23

20 2)  *$\beta$ -amiloide en solución*; se preincubó una concentración constante de  $\beta$ -amiloide con una serie de diluciones de variantes de anticuerpo 2E7 humanizado -se añadió la mezcla que incluía amiloide complejo y libre durante un corto periodo de tiempo a pocillos que contenían MAb 2E7 de ratón inmovilizado. Después se detectó la cantidad de  $\beta$ -amiloide libre que aún estaba disponible para unir el MAb 2E7 parental inmovilizado. La Tabla 9 muestra los resultados de los dos ensayos.

Tabla 9

MAb competidor	Experimento 1		Experimento 2	
	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Error Típico	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Error Típico
Quimera de 2E7c	0,052	0,006	-	-
H1L1	0,114	0,014	0,140	0,024
H2L1	0,075	0,009	0,119	0,014
H3L1	0,069	0,004	0,115	0,013

Todas las variantes de anticuerpo humanizado inhibían la unión del MAb 2E7 de ratón al β-amiloide con un perfil muy similar. Los valores de CI<sub>50</sub> generados para las variantes H2L1 y H3L1 fueron consistentemente próximos al de la quimera 2E7c (cuando se usó), que tenía la mayor actividad inhibitora en los dos ensayos. Sin embargo, la variante H1L1 mostró una actividad inhibitora algo reducida en los dos ensayos, indicando una posible afinidad ligeramente menor para el β-amiloide.

#### Análisis SPR Biacore™ de 2E7, 2E7c, H1L1, H2L1, H3L1

Se evaluaron los parámetros cinéticos del MAb 2E7 de ratón recombinante, 2E7c quimérico y las variantes humanizadas H1L1, H2L1 y H3L1 que se unen al péptido beta-amiloide humano (1-40) y (1-42) usando el análisis Biacore™ en un Biacore™ 3000. Se usaron dos formatos de ensayo diferentes.

#### Procedimiento A

(i) Brevemente, se capturaron < 20 unidades de resonancia del péptido beta-amiloide 1-40 (biotinilado en el extremo C-terminal) en un chip biosensor de estreptavidina (como el usado para la Tabla 10A). Los anticuerpos se diluyeron en tampón HBS-EP y se pasaron sobre la superficie de estreptavidina/beta-amiloide a concentraciones que variaban de 0,001 nM-8 nM (para la Tabla 10A). Se realizaron dos procesos separados; cada proceso se realizó en una nueva superficie de estreptavidina/beta-amiloide. Los procesos 1 y 2 fueron esencialmente iguales aunque hubo algunas diferencias en los parámetros usados; el proceso 1 se realizó usando una superficie de chip en la que se capturaron 16 Unidades de resonancia de beta-amiloide y se usaron concentraciones de anticuerpo de 0,001 nM-8 nM, un tiempo de asociación de 4 minutos y un tiempo de disociación de 20 minutos a un caudal de 50 µl por minuto. Para el proceso 2, se capturaron menos de 10 RU de beta-amiloide y se usaron concentraciones de anticuerpo de 0,003-125 nM-8 nM. El caudal y los tiempos de asociación fueron iguales a los del proceso 1, sin embargo el tiempo de disociación se redujo a 15 minutos. (ii) Los beta-amiloides (1-40) y (1-42) se acoplaron a amina en diferentes superficies de un chip biosensor CM5 a un nivel de < 20 unidades de resonancia (como se usa para la Tabla 10B). Los anticuerpos se diluyeron en tampón HBS-EP y se pasaron sobre la superficie de biosensor/beta-amiloide a concentraciones que variaban de 1 nM-64 nM (como se usa para la Tabla 10B).

#### Procedimiento B

En el segundo caso se invirtió el ensayo, porque primero se capturaron los anticuerpos a un nivel de 1000-2500 unidades de resonancia en una superficie de anticuerpo policlonal de IgG anti-ratón (para el MAb 2E7 de ratón recombinante) o una superficie con proteína A (para H2L1 humanizado) de un chip biosensor CM5. El beta-amiloide (1-40) o (1-42) recién preparado se diluyó en tampón HBS-EP y se pasó sobre la superficie con anticuerpo capturado a concentraciones que variaban de 4-500 nM (Tabla 10C y 10D).

En los dos procedimientos, la regeneración se realizó por un pulso de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM y para la Tabla 10A los datos también se siguieron por un pulso de NaOH 50 mM. Se demostró que la superficie era estable y no se veía afectada por la regeneración. Todos los procesos utilizaron dobles referencias contra inyecciones blanco de tampón. El análisis se realizó usando el software de análisis Biacore™ BIAevaluation versión 4.1.

#### Resultados

Se usó el procedimiento A(i) para clasificar los anticuerpos por los datos cinéticos de unión al beta-amiloide. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 10A. Esto demuestra que el MAb 2E7 parental tiene una KD de 36,1 pM para el beta-amiloide capturado por estreptavidina. El anticuerpo de ratón-humano quimérico mostró una KD ligeramente reducida de 45,8 pM y las construcciones humanizadas varían de 54 (H2L1) a 93,6 pM (H1L1). En conclusión, esto demuestra que el procedimiento de humanización había sido muy satisfactorio y se había perdido muy poca afinidad. Las retromutaciones adicionales introducidas para H2 y H3 tenían un efecto pequeño pero beneficioso, aunque las diferencias entre las construcciones de H2 y H3 están dentro de las desviaciones típicas para estos experimentos.

Tabla 10A

Anticuerpo		$k_a$	$k_d$	KD (pM)
2E7	Proceso 1	1,61e6	6,17e-5	38,3
	Proceso 2	1,69e6	5,72e-5	33,8
	Media (SD)	1,65e6	5,97e-5	36,1 (3,2)
c2E7	Proceso 1	1,34e6	6,44e-5	48,1
	Proceso 2	1,3e6	5,65e-5	43,5
	Media (SD)	1,32e6	6,10e-5	45,8 (3,3)
H1L1	Proceso 1	5,60e5	5,32e-5	95,0
	Proceso 2	6,37e5	5,87e-5	92,2
	Media (SD)	5,99e5	5,60e-5	93,6 (2,0)
H2L1	Proceso 1	9,91e5	5,76e-5	58,1
	Proceso 2	1,1e6	5,49e-5	49,8
	Media (SD)	1,05e6	5,63e-5	54,0 (5,9)
H3L1	Proceso 1	8,24e5	6,26e-5	76,0
	Proceso 2	8,3e5	4,75e-5	57,2
	Media (SD)	8,27e5	5,47e-5	66,6 (13,3)

5 El procedimiento A(ii) se usó para confirmar que los dos residuos aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del beta-amiloide (1-42) en comparación con el beta-amiloide (1-40) no alteraban significativamente las propiedades de unión de 2E7 y H2L1. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 10B y confirmaron esto.

Tabla 10B

Anticuerpo	Beta-amiloide	$k_a$ ( $\text{Ms}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\text{s}^{-1}$ )	KD (pM)
2E7	1-40	4,05e5	1,28e-4	317
	1-42	3,82e5	1,51e-4	394
H2L1	1-40	3,33e5	1,22e-4	366
	1-42	3,40e5	1,55e-4	456

10 El procedimiento B se usó para invalidar los efectos de avidéz que podían verse en el primer formato de ensayo. Los efectos de avidéz, producidos por los dos dominios Fab de una sola molécula de anticuerpo que se une al mismo tiempo a dos moléculas de beta-amiloide adyacentes en la superficie del biosensor (o en formas multiméricas de beta-amiloide) aumentarían la afinidad aparente de la unión. Las mediciones de afinidad obtenidas usando el procedimiento B se muestran en la Tabla 10C.

Tabla 10C

Anticuerpo	$k_a$ ( $\text{Ms}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\text{s}^{-1}$ )	KD (nM) Con Desviación Típica n = 3

<b>2E7</b>	2,83e5 ± 0,54e5	4,28e-4 ± 0,65e-4	1,58 ± 0,55
<b>H2L1</b>	1,06e5 ± 0,27e5	7,50e-4 ± 0,50	7,32 ± 1,64

La prueba de que este ensayo proporcionó afinidades de unión 1:1 verdaderas se obtuvo cuando fragmentos Fab de H2L1, obtenidos por digestión con papaína, se unieron al beta-amiloide (1-40) capturado con estreptavidina por un procedimiento similar al procedimiento A(i) con una KD estimada de 2,4 nM.

- 5 El procedimiento B también se usó para confirmar que los dos residuos aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del beta-amiloide (1-42) en comparación con el beta-amiloide (1-40) no alteraban significativamente las propiedades de unión de un clon de secuencia idéntica al MAb 2E7 de ratón, denominado 2F11. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 10D.

Tabla 10D

Anticuerpo	Beta-amiloide	ka (Ms <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	KD (nM)
<b>2F11</b>	<b>1-42</b>	2,39e5	2,74e-4	1,14
<b>2F11</b>	<b>1-40</b>	2,99e5	3,92e-4	1,31

10

En un estudio similar al estudio de mapeo de epítopes en 2E7 usando el Ensayo de Resonancia de Plasmón Superficial descrito anteriormente, H2L1 se comportó de forma similar al 2E7 en la unión al péptido que incluía los aminoácidos 1-12 (Aβ1, SEC ID N.º: 15) del péptido β-amiloide y no al péptido que incluía los aminoácidos 2-13 del péptido β-amiloide (Aβ2-13, SEC ID N.º: 44).

#### 15 Actividad de H2L1 en el modelo de flujo de salida de I<sup>125</sup> β-amiloide

Para comparar funcionalmente el H2L1 humanizado con el 2E7 monoclonal de ratón parental, los dos se ensayaron el mismo día en el modelo de flujo de salida de I<sup>125</sup> β-amiloide descrito anteriormente.

- 20 Tanto H2L1 como 2E7 aumentaron significativamente las cuentas por minuto (CPM) en sangre en comparación con un control de vehículo. El recuento de CPM de radiactividad en sangre fue el siguiente (vehículo: 1940 ± 166; 2E7 10065 ± 1386; H2L1 10913 ± 1535). Los parámetros estadísticos usados fueron ANOVA con ensayo post-hoc LSD. n = 7 vehículo, n = 6 2E7, n = 6 H2L1, (p < 0,001 para cada compuesto de ensayo frente a vehículo).

Estos datos proporcionan pruebas adicionales de que el anticuerpo H2L1 humanizado ha retenido las propiedades funcionales mostradas con la molécula 2E7 de ratón.

#### Investigación de la farmacocinética de H2L1 y 2E7

- 25 Se investigó la semivida terminal del anticuerpo de ensayo en ratones. El anticuerpo de ensayo se administró por una infusión intravenosa de 1 h a 4 ratones para conseguir una dosis diana de 400 µg por ratón. Se tomaron muestras de sangre seriadas a partir de cada ratón hasta 5 días después de la dosificación (un ratón del grupo de 2E7 no completó el estudio y uno del grupo de H2L1 se retiró del análisis posterior porque se hizo evidente que la dosis no se había administrado i.v.). Los niveles de anticuerpo se midieron usando un ELISA de captura de β-amiloide.

30

El análisis de los datos indica que el anticuerpo H2L1 humanizado tiene una semivida terminal de aproximadamente 82 horas en ratones (Tabla 11), que es comparable a la del anticuerpo monoclonal de ratón parental 2E7 (aproximadamente 75 horas).

Tabla 11

Parámetro	Media ± SD (n = 3)
Cmáx (ug/ml)	291 ± 43
Tmáx (h) #	2,0 (1,1-2,1)
CLp (ml/h/kg)	0,9 ± 0,1
t <sub>1/2</sub> (h)	82 ± 4
Vss (ml/kg)	94 ± 12

35

(continuación)

# mediana e intervalo	
C <sub>máx</sub>	Concentración máxima en plasma observada.
T <sub>máx</sub>	Tiempo transcurrido hasta la concentración máxima en plasma observada
CL <sub>p</sub>	Eliminación total en plasma; Dosis/AUC <sub>(0-inf)</sub> .
t <sub>1/2</sub>	La semivida de fase terminal se determinó como la relación de ln2/z donde z es la constante de la velocidad en fase terminal; calculada usando un análisis de regresión lineal no ponderado (después de la transformación logarítmica) en los pares de concentración-tiempo que se produjeron después del inicio evaluado visualmente de la fase terminal de log-lineal.
V <sub>ss</sub>	Volumen de distribución en estado estacionario; CL <sub>p</sub> x MRT <sub>0-inf</sub> .

#### Efecto de H2L1 sobre la carga de amiloide periférica en primates no humanos de edad avanzada

5 Se realizó un estudio en monos del género *Cynomolgus* de edad avanzada (de aproximadamente 15 años) para investigar la relación de respuesta a exposición con respecto a la formación de complejos de amiloide/H2L1 y la eliminación y los efectos posteriores sobre los niveles de amiloide del CSF y el SNC. Se recogieron muestras de sangre y de CSF lumbar (tomadas con sedación con ketamina) semanalmente 3 semanas antes de administrar la 1ª dosis de H2L1. Inmediatamente después del muestreo en la semana 3, los animales recibieron placebo (n = 10), 0,1 mg/kg (n = 5), 1 mg/kg (n = 5) o 10 mg/kg (n = 10) de H2L1 y después cada 2 semanas durante un período de 12 semanas. Se tomaron semanalmente muestras de sangre para realizar el análisis en plasma de H2L1 y Aβ<sub>42</sub> total. Se recogieron muestras de CSF para la cuantificación de Aβ<sub>40/42</sub> cada 2 semanas. Después de terminar el periodo de dosificación, los animales se sacrificaron para cuantificar en el cerebro el beta-amiloide por análisis bioquímico como se ha descrito anteriormente y para investigar las microhemorragias. En el grupo de menor dosificación (0,1 mg/kg), los animales se sacrificaron de forma escalonada para evaluar el posible efecto del transcurso del tiempo en los niveles cerebrales como consecuencia de la terminación de la dosificación y por lo tanto la saturación de las reservas plasmáticas de amiloide.

15 Este estudio se aprobó por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de MACCINE Pte Ltd, o "Maccine" antes de iniciar la fase experimental. El número de protocolo de IACUC fue n.º: 08-2006. GSK ha realizado una visita al centro de Maccine y ha revisado su procedimiento de revisión ética y lo ha encontrado aceptable.

20 Las muestras de plasma se diluyeron en serie 1:10 a 1:50000 y se añadieron a Aβ<sub>40</sub> aplicadas como un recubrimiento en placas ELISA. Se crearon curvas patrón que variaban de 0–10 µg/ml de H2L1 en diluyente. Después de una incubación de una noche a 4°C H2L1 se visualizó usando IgG anti-humana-peroxidasa de rábano picante (Amersham – diluido 1:2000 en diluyente) y un sistema de detección de tetrametilbencideno. Después de una administración iv en bolo individual y repetida, los niveles plasmáticos de H2L1 parecían aumentar de una manera dependiente de la dosis. No hubo indicios de ausencias de linealidad grave en la farmacocinética, lo que indica que para la mayor parte del intervalo de dosificación, se consiguieron concentraciones molares en exceso de H2L1 en el plasma en comparación con los niveles de amiloide libres.

25 La Aβ<sub>42</sub> total se midió en plasma puro usando un kit ELISA Aβ 1-42 comercialmente disponible (Innogenetics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, variando las curvas patrón de 500-7 pg/ml creados en el diluyente del kit. Las muestras y los patrones se incuban durante una noche a 4°C antes del ensayo por duplicado de acuerdo con las instrucciones del kit. Debe indicarse que debido a la interferencia del anticuerpo de detección suministrado con el ensayo de Aβ<sub>42</sub>, este kit no puede usarse para medir los niveles de Aβ<sub>42</sub> libre, sino que mide el Aβ<sub>42</sub> 'total' aparente. Hubo un aumento dependiente de la dosis y concentración en Aβ<sub>42</sub> (niveles mantenidos de aproximadamente 300, 125 y 25 pg/ml detectados después de 10, 1 o 0,1 mg/kg de H2L1 respectivamente).

30 Por los datos del análisis, es probable que el aumento en el "Aβ<sub>42</sub> total" se deba al resultado de un flujo de salida significativo de amiloide del exterior de las reservas plasmáticas, que parecía dependiente de las concentraciones de H2L1 > 1 µg/ml y no parecía ser el resultado de la ausencia de aclaramiento del complejo. Esto fue evidente por la velocidad de eliminación del Aβ<sub>42</sub> total así como por la fluctuación en los niveles totales en un intervalo de dosificación.

40

Hasta la fecha solo se han completado y analizado totalmente los análisis en plasma. Sin embargo los análisis preliminares indican que había una tendencia hacia la reducción en el CSF y hacia el aumento en el hipocampo del nivel de A $\beta$ 42 'total' (medido como se ha descrito anteriormente en general) después del tratamiento con 10 mg/kg de H2L1.

- 5 En algunas secciones cerebrales, se detectaron pequeñas áreas de microhemorragia como se muestra por el procedimiento de tinción con Azul de Prusia de Perls. Este procedimiento visualiza el hierro férrico (el hierro es un constituyente esencial de la hemoglobina que lleva el oxígeno presente en los glóbulos rojos) produciendo un compuesto azul insoluble. Sin embargo, no hubo ninguna diferencia en la incidencia entre los animales tratados con vehículo y los tratados con fármaco.

#### 10 **Análisis en macacos del género *Cynomolgus* de edad avanzada de placas de beta amiloide en el cerebro y del beta amiloide total en el plasma**

En el mono cinomolgo se han presentado parámetros del líquido cefalorraquídeo (CSF) y de tejidos de la AD humana. Se ha demostrado que el mono cinomolgo de edad avanzada tiene indicios de deposición de amiloides. (Covance, The cynomolgus monkey as a model for Alzheimer's disease. En: Buse E, Habermann G, Friderichs-Gromoll S, Kaspereit J, Nowak P y Niggemann K, editores. Poster Presentation at the 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nueva Orleans, Luisiana, del 6 al 10 de marzo de 2005). La posibilidad de que H2L1 induzca una respuesta inapropiada (tal como encefalitis) en un cerebro envejecido se investigó en monos hembra que habían tenido crías previamente de edad avanzada, de aproximadamente 20 años. Además, también se investigaron la seguridad, las microhemorragias relacionadas con el tratamiento, la neutralización/eliminación del material de ensayo, la hipersensibilidad y la enfermedad por complejos inmunes después de la administración intravenosa durante 8 semanas en intervalos de dos semanas. Además se analizaron los niveles de A $\beta$ <sub>40/42</sub> en muestras del SNC y de sangre.

#### **Diseño del estudio**

25 A grupos de 5 (grupo 1), 9 (grupo 2) o 10 (grupo 3) monos cinomolgos hembra geriátricos se les administraron 0 (vehículo), 50 o 100 mg/kg/día de dosificación de H2L1 en vehículo (4 ml/kg) una semana sí y otra no durante un periodo de 8 semanas, por vía intravenosa por medio de una administración en embolada lenta. El vehículo consistía en acetato sódico trihidrato a 6,81 mg/ml, edetato disódico dihidrato a 0,0186 mg/ml, polisorbato 80 a 0,2 mg/ml y base L-Arginina a 10 mg/ml y el pH fue de 5,5. Los niveles de dosificación se eligieron para investigar niveles de dosificación que eran 5 y 10 veces los niveles de dosificación clínica deseada.

30 Las siguientes evaluaciones se realizaron antes de la dosificación, diariamente (signos clínicos, peso corporal, consumo de alimentos), en la semana 4 y en la semana anterior a la necropsia: observaciones en el animal vivo, peso corporal, temperatura corporal, hematología, química clínica (incluyendo el análisis del líquido cefalorraquídeo [CSF]), urianálisis y determinación de citocinas en CSF. Después de la necropsia, se determinaron los pesos de los órganos, observaciones macroscópicas y observaciones microscópicas del cerebro, médula espinal cervical y lesiones generales en todos los animales. Después de cada dosificación se realizó una evaluación toxicocinética.

#### **Resultados**

40 No hubo muertes no programadas y no se produjeron signos que indicaran una influencia del artículo de ensayo sobre el estado general de los animales a las dosis administradas. Las únicas observaciones destacadas en la patología clínica (hematología y química del suero), según se concluyó estaban relacionadas con la edad y no con el artículo de ensayo.

La exposición sistémica a H2L1 (medida por AUC<sub>0-t</sub> y C<sub>máx</sub>) aumentó aproximadamente en proporción a la dosis. Para los dos grupos de dosificación, no hubo un cambio marcado ( $\geq 2$  veces) en la exposición sistémica entre la 1ª dosis y la 4ª dosis de los periodos de muestreo.

45 No se detectó ningún signo de reacciones inflamatorias en el cerebro detectadas por análisis del CSF y no hubo ningún hallazgo macroscópico o microscópico en la necropsia que sugiriera la influencia del artículo de ensayo, específicamente no se produjeron microhemorragias ni encefalitis.

50 Este estudio se realizó de acuerdo con las Regulaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio como se indica en la Ley Alemana sobre Productos Químicos, anexo 1 y 2 en el artículo §19a Chemikalien Gesetz, junio de 2002, los Principios de OECD de Buena Práctica de Laboratorio (revisado en 1997, expedido en enero de 1998) ENV/MC/CHEM (98) 17 y el Documento Consenso "The Application of the OECD Principles of GLP to the Organisation and Management of Multi-Site Studies" ENV/JM/MONO(2002)9. Los estudios realizados de acuerdo con las regulaciones y normas anteriores se consideraron aceptables para las autoridades reguladoras de la FDA de Estados Unidos.

#### **Análisis de la carga de placas en el SNC**

55 Los hemisferios cerebrales izquierdos de los macacos cinomolgos tratados con vehículo del estudio anterior se

5 analizaron por inmunohistoquímica. Una sección en corona, a nivel del surco temporal medio que contenía partes del giro dentado y del hipocampo se procesó en cera como se ha descrito anteriormente. Para la inmunohistoquímica, las secciones se marcaron con un anticuerpo pan-A $\beta$  (1E8, anticuerpo monoclonal inducido contra A $\beta$  13-27) o con el anticuerpo A $\beta$ 42 (20G10, anticuerpo monoclonal que reconoce a A $\beta$  x-42) y el marcaje se realizó como se ha indicado anteriormente. Para cada sección se tomó un recuento visual del número de placas. Los tejidos de todos los cinco monos cinomolgos tratados con vehículo mostraron indicios de placas de A $\beta$  parenquimáticas. También hubo indicios de A $\beta$  marcado cerebrovascular y A $\beta$  intraneuronal.

#### 10 **Análisis de complejos de beta amiloide/anticuerpo en plasma**

15 Se realizó un análisis bioquímico en muestras plasmáticas a partir de dos momentos (al final de las semanas 4 y 8 después de iniciar la dosificación) de animales que recibieron 50 mg/kg (n = 9) o 100 mg/kg (n = 10) de H2L1 o controles que recibieron vehículo (n = 5). Se analizaron muestras duplicadas de 100  $\mu$ l usando el kit ELISA de A $\beta$  1-42 Innogenetics comercialmente disponible, incubadas durante una noche a 4°C. Las muestras de control se analizaron tanto puras como a una dilución 1:10 (usando el diluyente suministrado), mientras que las muestras de los animales que recibieron la dosificación se ensayaron puras y a 1:25. Se analizaron los valores de absorbancia posteriores, deduciéndose los valores de absorbancia desconocidos en pg/ml usando curvas patrón y después se corrigieron para cualquier dilución del ensayo. Los niveles plasmáticos totales de A $\beta$ 42 obtenidos a partir de estas muestras se proporcionan en la Tabla 12 que se presenta más adelante (las cifras están en pg/ml  $\pm$  SE); todas las muestras de los animales tratados con H2L1 contenían niveles significativamente mayores de A $\beta$ 42 (p < 0,001 por ensayo t de Student) que en los grupos de control.

20

**Tabla 12**

	Semana 4 (pg/ml)	Semana 8 (pg/ml)
<b>Control (1:10)</b>	104,1 $\pm$ 30,4	29,8 $\pm$ 7,9
<b>50 mg/kg (1:25)</b>	830,5 $\pm$ 79,1	615,8 $\pm$ 50,2
<b>100 mg/kg (1:25)</b>	1020,5 $\pm$ 84,4	492,7 $\pm$ 46,3

Los datos presentados se obtuvieron a partir de muestras diluidas. Los resultados de las muestras puras no se usaron ya que muchos puntos de datos eran mayores que el patrón superior o debido a la limitación del volumen de la muestra, solo se ensayaron como un solo punto.

#### 25 **Proceso de producción**

Pueden usarse vectores de expresión que codifican H2L1 y unirse operativamente a marcadores de selección amplificables tales como la DHFR o la glutamina sintetasa para transfectar o transducir líneas de células CHO parentales apropiadas (por ejemplo, CHODG44 o CHOK 1) para producir líneas celulares modificadas por ingeniería genética adecuadas para la producción de anticuerpo monoclonal a gran escala (como revisión, véase Bebbington and Hentschel DNA Cloning Volume III; A practical approach (editado por Glover DM) (Oxford IRL press, 1987)). Para aumentar los niveles de expresión la secuencia codificante puede optimizarse con respecto a sus codones para evitar restos de secuencia de actuación cis y contenidos extremos de GC (altos o bajos). Las SEC. ID N.º: 42 y N.º: 43 ilustran esta secuencia codificante para la cadena pesada H2 y la cadena ligera L1. La producción a gran escala puede realizarse en biorreactores de depósito con agitación usando medio sin componentes de origen animal, seguido de purificación. Esto puede comprender la clarificación del material recogido, seguido de cromatografía de afinidad de proteína A y la purificación adicional usando intercambio iónico (por ejemplo, catiónico) y operaciones en unidades de cromatografía de modo mixto (por ejemplo, hidroxapatita cerámica). Una nanofiltración para la eliminación de virus se continúa por una etapa de ultrafiltración/diafiltración final que permite formulación adecuada para la vía de administración deseada.

#### 40 **Ejemplo de Formulación farmacéutica**

Ingrediente	Cantidad (por ml)
H2L1	50 mg
Acetato sódico trihidrato	6,81 mg
Polisorbato 80	0,20 mg
Base arginina	10,00 mg
Cloruro sódico	3,00 mg

45

(cont.)

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (por ml)</u>
	Edetato disódico dihidrato	0,0186 mg
	Ácido clorhídrico	c.s. para dar pH 5,5
5	Agua para inyección	Hasta 1,0 ml
	Nitrógeno	Hasta rellenar el espacio superior

**Secuencias de aminoácidos de regiones V de armazonesceptoras y variantes humanizadas**

**Región V de armazón aceptora de cadena pesada de M99675, secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 21)**

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDN**AKN  
SLYLQMN**SLRAEDTAVYYCAR**

**ADN de región V de armazón aceptora de cadena pesada de M99675 (SEC ID N.º: 22)**

15 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC  
TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTT  
CATACATTAGTAGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA  
ATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA  
GA

**Secuencia de aminoácidos de región V de armazón aceptora de cadena ligera de CAA51135 (SEC ID N.º: 24)**

20 DIVMTQSPLSLPVT**PGEPASISCRSSQSLHNSGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLIYLSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTL**  
KISRVEAEDVGVYY**CMQALQTPWTFGQGTKVEIK**

**ADN de región V de armazón aceptora de cadena ligera de CAA51135 (SEC ID N.º: 25)**

25 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC  
TAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACTAATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC  
AGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACA  
GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACT  
CCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAA

**Variante H1 de región V de cadena pesada humanizada, secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 26)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWV**SFISNLAYSIDYADTVTGRFTISRDNAKN  
SLYLQMN**SLRAEDTAVYYCVSGTWFA**YWGQGLTVVSS

**Secuencia codificante de ADN de variante H1 de región V de cadena pesada humanizada (SEC ID N.º: 27)**

30 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC  
TCTGGATTCACCTTCAGTGACAACCGAATGGCGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTT  
CATTCATTAGTAATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA  
ATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGC  
GGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

35 **Variante H2 de región V de cadena pesada humanizada, secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 28)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWV**SFISNLAYSIDYADTVTGRFTISRDNAKN  
SLYLQMN**SLRAEDTAVYYCVSGTWFA**YWGQGLTVVSS

**ADN de variante H2 de región V de cadena pesada humanizada (SEC ID N.º: 29)**

40 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTC  
TCTGGATTCACCTTCAGTGACAACCGAATGGCGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTT  
CATTCATTAGTAATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA  
ATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGC  
GGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

**Variante H3 de región V de cadena pesada humanizada, secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 30)**

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKLEWISFISNLAYSIDYADTVTGRFTISRDN**AKN  
SLYLQMN**SLRAEDTAVYYCVSGTWFA**YWGQGLTVVSS

**ADN de variante H3 de región V de cadena pesada humanizada (SEC ID N.º: 31)**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC  
TCTGGATTCACCTTCAGTGACAACGGAATGGCGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCT  
5 CATTCAATAGTAATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCCACATCTCCAGAGACA  
ATGCCAAGAAGCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGC  
GGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

**Secuencia de aminoácidos de variante L1 de región V de cadena ligera humanizada (SEC ID N.º: 32)**

DIVMTQSPLSLPVTGPASPISCRVVSQSLHLSNGYTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTL  
KISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGTKVEIK

**ADN de variante L1 de región V de cadena ligera humanizada (SEC ID N.º: 33)**

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGAGT  
TAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACA  
GCTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAG  
15 ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTCTCAAACCTAGACATGTTT  
CGTACACGTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGAAATCAAA

**Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de H1 madura (Fc mutado, mutación doble en negrita) (SEC ID N.º: 34)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNLAYSIDYADTVTGRFTISRDNANKN  
20 SLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
ELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**ADN de longitud completa de H1 (SEC ID N.º: 35)**

**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG**  
**GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG**  
**GATTCACCTTCAGTGACAACGGAATGG**  
**CGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGT**  
**AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCA**  
**GACACTGTGACGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAGTCACTG**  
**TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC**  
**CGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTACAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGG**  
**GCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCT**  
**CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC**  
**ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC**  
**TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAG**  
**CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT**  
**CCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG**  
**TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA**  
**CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA**  
**GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT**  
**CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTT**  
**CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACAC**  
**CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC**  
**ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT**  
**GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA**  
**GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC**  
**AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG**  
**CAAGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC**  
**CCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG**  
**TGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG**  
**AGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA**  
**GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC**  
**AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA**  
**CGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCT**

**CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA**  
**TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA**  
**CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA**

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de H2 madura (Fc mutado, doble mutación en negrita) (SEC ID N.º: 36)

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNLAYSIDYADTVTGRFTISRDNAKN  
 SLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAP  
 ELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
 10 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ADN de longitud completa de H2 (SEC ID N.º: 37)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATT  
 CACCTTCAGTGACAACCGAATGGCGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG  
 CTGGAGTGGGTTTCATTATTAGTAATT  
 TGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCACCATCTCCA  
 GAGACAATGCCAAGAAGTCACTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGTCAG  
 CGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA  
 GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCC  
 CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCT  
 CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC  
 GGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCC  
 CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA  
 CTCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC  
 CTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA  
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG  
 AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC  
 TCGCGGGGGCACCGTCACTCTTCCCT  
 TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA  
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA  
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  
 CCAAGACAAAGCCGCGGGGAGGAGCAGT  
 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG  
 GTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAA  
 GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA  
 CACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCG

ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC  
 CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC  
 TCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG  
 GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA  
 AA

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de H3 madura (Fc mutado, mutación doble en **negrita**) (SEC ID N.º: 38)

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWISFISNLAYSIDYADTVTGRFTISRDN  
 SLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFA<sup>W</sup>YWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCTPPCPAP  
 ELA<sup>G</sup>APS<sup>V</sup>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
 10 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ADN de longitud completa de H3 (SEC ID N.º: 39)

15 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC  
 TCTGGATTACCTTCAGTGACAACCGAATGGCGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCT  
 CATTATTAGTAATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA  
 ATGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGTCAGC

GGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG  
TCTTCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA  
CTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTC  
5 CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT  
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA  
ACTCACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGTGCAGGGGGCACCGTCACTTCTTCCCCCAAAAC  
CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC  
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
10 TACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA  
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG  
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCGTGCCTG  
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGA  
CCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG  
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG

15 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA

**Secuencia de aminoácidos de cadena ligera madura (SEC ID N.º: 40)**

DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRVVSQSLLSHNGYTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
KISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD  
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 **ADN de longitud completa de L1 (SEC ID N.º: 41)**

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGAGT  
TAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACA  
GCTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAG  
ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCTCTCAAAGTACATGTTT  
25 CGTACACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGTACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCG  
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC  
AAAGTACAGTGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA  
AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC  
CTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

30 **ADN de cadena pesada de H2 optimizada (SEC ID N.º: 42)**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGTG  
TCCGGCTTACCTTCAGCGACAACGGCATGGCCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG  
TCCTTATCAGCAACCTGGCCTACAGCATCGACTACGCCGACACCGTGACCCGGCAGATTACCATCAGCCGGG  
ACAACGCCAAGAAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCCCGTGTACTACTGTGT  
35 GAGCGGCACCTGGTTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCC  
CAGCGTGTTCGCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCCAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA  
GGACTACTTCCCGAACCAGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCC  
GCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTACCGTGCACAGCAGCCTGGGCACC  
CAGACCTACATCTGTAACGTGAACACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCT  
40 GTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGGCCGGAGCCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCC  
CCCCAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGATGTGAGCCAC  
GAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGAGCGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGCAAGCCAGGAGG  
GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCA  
AGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG  
45 CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG  
ACCTGCCTGGTGAAGGGCTTACCCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAAC  
AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAA  
GAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAG  
AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

50 **ADN de cadena ligera L1 optimizada (SEC ID N.º: 43)**

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTACCCCTGGCGAGCCCCGCCAGCATCAGCTGTAGA  
GTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCTACACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCC  
CTCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGTTTCAGCGGCGTGCCTGATAGATTGAGCGGCAGCGGCTCCGG  
CACCGACTTACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGATGTGGGCGTGTACTACTGCTCCAGACCAGA  
55 CACGTGCCTTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTC  
TCTTCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCCGACCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCC  
CCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGA  
GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC



ES 2 484 967 T3

<211> 7

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 5

5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Ratón

<400> 6

Ser Gln Thr Arg His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

15

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

20

<221> MOD\_RES

<222> (16)...(0)

<223> Biotinilada

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Ser Lys

25

1 5 10 15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido

<221> MOD\_RES

<222> (16)...(0)

<223> Biotinilada

35

<400> 8

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys

1 5 10 15

ES 2 484 967 T3

<210> 9  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Péptido  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)...(0)  
<223> Biotinilada  
10 <400> 9  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Lys  
1 5 10 15  
<210> 10  
<211> 16  
15 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido  
<221> MOD\_RES  
20 <222> (16)...(0)  
<223> Biotinilada  
<400> 10  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys  
1 5 10 15  
25 <210> 11  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Péptido  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)...(0)  
<223> Biotinilado  
<400> 11  
35 Asp Ala Glu Phe Arg His Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Lys  
1 5 10 15  
<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido

<221> MOD\_RES

<222> (16)...(0)

<223> Biotinilada

<400> 12

10 Asp Ala Glu Phe Arg Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Lys  
 1 5 10 15

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<221> MOD\_RES

<222> (16)...(0)

20 <223> Biotinilada

<400> 13

Asp Ala Glu Phe Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys  
 1 5 10 15

25 <210> 14

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Peptido

<221> MOD\_RES

<222> (16)...(0)

40 <223> Biotinilada

<400> 14

Asp Ala Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Lys  
 1 5 10 15

ES 2 484 967 T3

<210> 15  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Péptido  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)...(0)  
<223> Biotinilada  
10 <400> 15  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Gly Ser Gly Lys  
1 5 10 15  
<210> 16  
<211> 16  
15 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido  
<221> MOD\_RES  
20 <221> Acetilación  
<222> (1)...(0)  
<222> Biotinilada  
<222> (16)...(0)  
<223> Biotinilada  
25 <400> 16  
Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ser Gly Lys  
1 5 10 15  
<210> 17  
<211> 115  
30 <212> PRT  
<213> Ratón  
<400> 17

ES 2 484 967 T3

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

<210> 18

<211> 345

<212> ADN

5 <213> Ratón

<400> 18

gagggtgaagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggaggggtc cctgaaactc 60  
 tcctgtgcag tctctggatt cactttcagt gacaacggaa tggcgtgggt tcgacaggct 120  
 ccaaggaagg ggcctgagtg gatagcgttc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180  
 gcagacactg tgacgggccg attcaccatc tctagagata atgccaagaa taccctgtac 240  
 ctggaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt actatttgtt aagcgggacc 300  
 tggtttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 19

<211> 112

10 <212> PRT

<213> Ratón

<400> 19

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

Arg His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                  105                  110

<210> 20

15 <211> 336

<212> ADN

<213> Ratón

ES 2 484 967 T3

<400> 20

```

gatgttgtgc tgacccaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gagttagtca gagcctttta cacagtaatg gatacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtffc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctggggagt tatttctgct ctcaaactag acatgttccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336
    
```

<210> 21

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Humano

<400> 21

```

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

<210> 22

10 <211> 296

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 22

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtagtagtac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaga 296
    
```

15 <210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Humano

<400> 23

20 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 112

ES 2 484 967 T3

<212> PRT

<213> Humano

<400> 24

```

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

```

```

65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85      90      95
Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100     105     110

```

5 <210> 25

<211> 336

<212> ADN

<213> Humano

<400> 25

```

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactccg 300
tggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

```

10

<210> 26

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Humanizada

<400> 26

ES 2 484 967 T3

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

<210> 27

<211> 345

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 27

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gacaacggaa tggcgtgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcattc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180  
 gcagacactg tgacgggccc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcgggacc 300  
 tggtttgctt actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctca 345

<210> 28

<211> 115

10 <212> PRT

<213> Humano

<400> 28

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

<210> 29

15 <211> 345

<212> ADN

ES 2 484 967 T3

<213> Humano

<400> 29

```

gaggtgcagc  tgggtggagtc  tgggggaggc  ttggtacagc  ctgggggggtc  cctgagactc  60
tcctgtgcag  tctctggatt  caccttcagt  gacaacggaa  tggcgtgggt  ccgccaggct  120
ccaggaaggg  ggctggagtg  ggtttcattc  attagtaatt  tggcatatag  tatcgactac  180
gcagacactg  tgacgggccg  attcaccatc  tccagagaca  atgccaagaa  ctcactgtat  240
ctgcaaatga  acagcctgag  agccgaggac  acggctgtgt  attactgtgt  cagcgggacc  300
tggtttgctt  actggggcca  gggcacacta  gtcacagtct  cctca      345
    
```

<210> 30

5 <211> 115

<212> PRT

<213> Humano

<400> 30

```

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

10 <210> 31

<211> 345

<212> ADN

<213> Humano

<400> 31

```

gaggtgcagc  tgggtggagtc  tgggggaggc  ttggtacagc  ctgggggggtc  cctgagactc  60
tcctgtgcag  cctctggatt  caccttcagt  gacaacggaa  tggcgtgggt  ccgccaggct  120
ccaggaaggg  ggctggagtg  gatctcattc  attagtaatt  tggcatatag  tatcgactac  180
gcagacactg  tgacgggccg  attcaccatc  tccagagaca  atgccaagaa  ctcactgtat  240
ctgcaaatga  acagcctgag  agccgaggac  acggctgtgt  attactgtgt  cagcgggacc  300
tggtttgctt  actggggcca  gggcacacta  gtcacagtct  cctca      345
    
```

15

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Humano

20 <400> 32

ES 2 484 967 T3

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

Arg His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 33

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 33

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60  
 atctcctgca gagttagtca gagcctttta cacagtaatg gatacaccta ttacattgg 120  
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180  
 tctggggctcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgct ctcaaactag acatgttccg 300  
 tacacgttcg gcggagggac caagggtgaa atcaaa 336

<210> 34

<211> 445

10 <212> PRT

<213> Humano

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn  
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu  
 225 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

His Tyr Thr 420  
 435 Gln Lys Ser Leu Ser 440 Leu Ser Pro Gly Lys 430  
 445

<210> 35

<211> 1335

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 35

ES 2 484 967 T3

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gacaacggaa tggcgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcattc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180
gcagacactg tgacgggccc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcgggacc 300
tggtttgctt actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc 360
ccatcgggtc tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcgcgg gggcaccgtc agtcttctc 720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaa 1335

```

<210> 36

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 36

ES 2 484 967 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn  
 20 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 165 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu  
 225 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 310 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 325 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 340 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 355 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 370 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 385 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 400 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 37

<211> 1335

5 <212> ADN

<213> Humano

<400> 37

ES 2 484 967 T3

```

gaggtgcagc  tgggtggagtc  tgggggaggc  ttggtacagc  ctggggggtc  cctgagactc  60
tcctgtgcag  tctctggatt  caccttcagt  gacaacggaa  tggcgtgggt  ccgccaggct  120
ccaggggaagg  ggctggagtg  ggtttcattc  attagtaatt  tggcatatag  tatcgactac  180
gcagacactg  tgacggggccg  attcaccatc  tccagagaca  atgccaagaa  ctcactgtat  240
ctgcaaatga  acagcctgag  agccgaggac  acggctgtgt  attactgtgt  cagcgggacc  300
tggtttgctt  actggggcca  gggcacacta  gtcacagtct  cctcagcctc  caccaagggc  360
ccatcgggtc  tccccctggc  accctcctcc  aagagcacct  ctgggggcac  agcggccctg  420
ggctgcctgg  tcaaggacta  cttccccgaa  ccggtgacgg  tgctcgtggaa  ctcaggcgcc  480
ctgaccagcg  gcgtgcacac  cttccccggt  gtcctacagt  cctcaggact  ctactccctc  540
agcagcgtgg  tgaccgtgcc  ctccagcagc  ttgggcaccc  agacctacat  ctgcaacgtg  600
aatcacaagc  ccagcaacac  caaggtggac  aagaaagttg  agcccaaadc  ttgtgacaaa  660
actcacacat  gcccaccgtg  cccagcacct  gaactcgcgg  gggcacccgc  agtcttcctc  720
ttcccccaa  aacccaagga  caccctcatg  atctcccgga  cccctgaggt  cacatgcgtg  780
gtggtggacg  tgagccacga  agaccctgag  gtcaagttca  actggtacgt  ggacggcgtg  840
gaggtgcata  atgccaagac  aaagccgcgg  gaggagcagt  acaacagcac  gtaccgtgtg  900
gtcagcgtcc  tcaccgtcct  gcaccaggac  tggctgaatg  gcaaggagta  caagtgcag  960
gtctccaaca  aagccctccc  agcccccatc  gagaaaacca  tctccaaagc  caaagggcag  1020
ccccgagaac  cacaggtgta  caccctgccc  ccattcccggg  atgagctgac  caagaaccag  1080
gtcagcctga  cctgcctggg  caaaggcttc  tatcccagcg  acatcgccgt  ggagtgggag  1140
agcaatgggc  agccggagaa  caactacaag  accacgcctc  ccgtgctgga  ctccgacggc  1200
tccttcttc  tctacagcaa  gctcaccgtg  gacaagagca  ggtggcagca  ggggaacgtc  1260
ttctcatgct  ccgtgatgca  tgaggctctg  cacaaccact  acacgcagaa  gagcctctcc  1320
ctgtctccgg  gtaaa  1335

```

<210> 38

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 38

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

<210> 39

<211> 1335

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 39

```

gaggtgcagc  tgggtggagtc  tggggggaggc  ttggtacagc  ctgggggggtc  cctgagactc  60
tcctgtgcag  cctctggatt  caccttcagt  gacaacggaa  tggcgtgggt  ccgccaggct  120
ccaggggaagg  ggctggagtg  gatctcattc  attagtaatt  tggcatatag  tatcgactac  180
gcagacactg  tgacgggccc  attcaccatc  tccagagaca  atgccaagaa  ctcaactgat  240
ctgcaaatga  acagcctgag  agccgaggac  acggctgtgt  attactgtgt  cagcgggacc  300
tggtttgctt  actggggcca  gggcacacta  gtcacagtct  cctcagcctc  caccaagggc  360
ccatcggctt  tccccctggc  accctcctcc  aagagcacct  ctggggggcac  agcggccctg  420
ggctgcctgg  tcaaggacta  cttccccgaa  cgggtgacgg  tgtcgtggaa  ctcaggcgcc  480
ctgaccagcg  gcgtgcacac  cttccccggt  gtcctacagt  cctcaggact  ctactccctc  540
agcagcgtgg  tgaccgtgcc  ctccagcagc  ttgggcaccc  agacctacat  ctgcaactgt  600
aatcacaagc  ccagcaacac  caaggtggac  aagaaagtgt  agcccaaadc  ttgtgacaaa  660
actcacacat  gcccaccgtg  cccagcacct  gaactcgcgg  gggcacccgtc  agtcttctc  720
ttcccccaa  aacccaagga  caccctcatg  atctcccgga  cccctgagg  cacatgcgtg  780
gtggtggacg  tgagccacga  agaccctgag  gtcaagttca  actggtacgt  ggacggcgtg  840
gaggtgcata  atgccaagac  aaagccgcgg  gaggagcagt  acaacagcac  gtaccgtgtg  900
gtcagcgtcc  tcaccgtcct  gcaccaggac  tggctgaatg  gcaaggagta  caagtgcag  960
gtctccaaca  aagccctccc  agccccatc  gagaaaacca  tctccaaagc  caaagggcag  1020
ccccgagaac  cacaggtgta  caccctgccc  ccatcccggg  atgagctgac  caagaaccag  1080
gtcagcctga  cctgcctggt  caaaggcttc  tatcccagcg  acatcgccgt  ggagtgggag  1140
agcaatgggc  agccggagaa  caactacaag  accacgcctc  ccgtgctgga  ctccgacggc  1200
tccttcttcc  tctacagcaa  gctcaccgtg  gacaagagca  ggtggcagca  ggggaacgtc  1260
ttctcatgct  ccgtgatgca  tgaggctctg  cacaaccact  acacgcagaa  gagcctctcc  1320
ctgtctccgg  gtaaa  1335
    
```

<210> 40

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Humano

<400> 40

```

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

<210> 41

10 <211> 657

ES 2 484 967 T3

<212> ADN

<213> Humano

<400> 41

gatattgtga	tgactcagtc	tccactctcc	ctgcccgtca	cccctggaga	gccggcctcc	60
atctcctgca	gagttagtca	gagcctttta	cacagtaatg	gatacaccta	tttacattgg	120
tacctgcaga	agccagggca	gtctccacag	ctcctgatct	ataaagtttc	caaccgattt	180
tctgggggtcc	ctgacaggtt	cagtggcagt	ggatcaggca	cagattttac	actgaaaatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tgttgggggt	tattactgct	ctcaaactag	acatgttccg	300
tacacgttcg	gcgaggggac	caaggtggaa	atcaaacgta	cggtggctgc	accatctgtc	360
ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	420
ctgaataact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtgga	agggtggaaa	cgccctccaa	480
tcgggtaact	cccaggagag	tgctacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctc	540
agcagcacc	tgacgctgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaaagtcta	cgctctcgaa	600
gtcaccatc	agggcctgag	ctcggcccgtc	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgt	657

5 <210> 42

<211> 1335

<212> ADN

<213> Humano

<400> 42

gaggtgcagc	tggtggagtc	tggcggcgga	ctggtgcagc	ctggcggcag	cctgagactg	60
agctgtgccg	tgtccggctt	caccttcagc	gacaacggca	tggcctgggt	gaggcaggcc	120
cctggcaagg	gcctggagtg	ggtgtccttc	atcagcaacc	tggcctacag	catcgactac	180
gccgacaccg	tgaccggcag	attcaccatc	agccgggaca	acgccaagaa	cagcctgtac	240
ctgcagatga	acagcctgag	agccgaggac	accgccgtgt	actactgtgt	gagcggcacc	300
tggttcgctt	actggggcca	gggcaccctg	gtgaccgtgt	ccagcggccag	caccaagggc	360
cccagcgtgt	tccccctggc	ccccagcagc	aagagcacca	gcggcggcac	agccgcccctg	420
ggctgcctgg	tgaaggacta	cttccccgaa	ccggtgaccg	tgtcctggaa	cagcggagcc	480
ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttccccgcc	gtgctgcaga	gcagcggcct	gtacagcctg	540
agcagcgtgg	tgaccgtgcc	cagcagcagc	ctgggcaccc	agacctacat	ctgtaacgtg	600
aaccacaagc	ccagcaacac	caaggtggac	aagaaggtgg	agcccaagag	ctgtgacaag	660
accacacact	gccccccctg	ccctgcccc	gagctggccg	gagccccag	cgtgttcctg	720
ttcccccca	agcctaagga	cacctgatg	atcagcagaa	ccccgaggt	gacctgtgtg	780
gtggtggatg	tgagccacga	ggaccctgag	gtgaagtcca	actggtacgt	ggacggcgtg	840
gaggtgcaca	atgccaagac	caagcccagg	gaggagcagt	acaacagcac	ctaccgggtg	900
gtgtccgtgc	tgaccgtgct	gcaccaggat	tggctgaacg	gcaaggagta	caagtgtaa	960
gtgtccaaca	aggccctgcc	tgcccctatc	gagaaaacca	tcagcaaggc	caagggccag	1020
cccagagagc	cccaggtgta	cacctgccc	cctagcagag	atgagctgac	caagaaccag	1080
gtgtccctga	cctgcctggt	gaagggcttc	taccccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	1140
agcaacggcc	agcccagaaa	caactacaag	accaccccc	ctgtgctgga	cagcgatggc	1200
agcttcttcc	tgtacagcaa	gctgaccgtg	gacaagagca	gatggcagca	gggcaacgtg	1260

ttcagctgct	ccgtgatgca	cgaggccctg	cacaatcact	acaccagaa	gagcctgagc	1320
ctgtcccctg	gcaag					1335

10

<210> 43

<211> 657

<212> ADN

<213> Humano

15 <400> 43

ES 2 484 967 T3

```

gacatcgtga tgacccagag cccctgagc ctgcccgtga cccctggcga gcccgccagc 60
atcagctgta gagtgagcca gagcctgctg cacagcaacg gctacaccta cctgcactgg 120
tatctgcaga agcctggcca gagccctcag ctgctgatct acaagggtgc caaccggttc 180
agcggcgtgc ctgatagatt cagcggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
agcagagtgg aggccgagga tgtgggctg tactactgct ccagaccag acacgtgcct 300
tacacctttg gcggcggaac aaagggtggag atcaagcgtg cgggtggccg cccagcgtg 360
ttcatcttcc ccccagcga tgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa tgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaagggtgta cgcctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaaccgggg cgagtgc 657

```

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<221> MOD\_RES

<222> (16)...(0)

10 <223> Biotinilada

<400> 44

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gly Ser Gly Lys

1

5

10

15

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido  $\beta$ -amiloide y que comprende las siguientes CDR:
- CDRH1: DNGMA (SEC ID N.º: 1)
- 5 CDRH2: FISNLAYSIDYADTVTG (SEC ID N.º: 2)
- CDRH3: GTWFAY (SEC ID N.º: 3)
- dentro de un armazón de una región variable de cadena pesada humana que se origina a partir de la familia de genes VH3 y:
- CDRL1: RVSQSLLHSNGYTYLH (SEC ID N.º: 4)
- 10 CDRL2: KVSNRFS (SEC ID N.º: 5)
- CDRL3: SQTRHVPYT (SEC ID N.º: 6)
- dentro de un armazón de una región variable de cadena ligera humana que se origina a partir de la secuencia de aminoácidos desvelada en la SEC ID N.º: 24.
- 15 2. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo se une al péptido  $\beta$ -amiloide 1-12 (SEC ID N.º: 15) con constante de equilibrio KD de menos de 100 pM y tiene una constante de equilibrio KD para unión a péptido  $\beta$ -amiloide 2-13 (SEC ID N.º: 44) que es 1000 veces mayor que aquella para péptido 1-12 (SEC ID N.º: 15), haciéndose ambas determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando péptido capturado en chip de estreptavidina.
- 20 3. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo se une al péptido  $\beta$ -amiloide 1-40 con constante de equilibrio KD de menos de 10 nM y tiene una constante de equilibrio KD para unión a péptido  $\beta$ -amiloide 2-13 (SEC ID N.º: 44) que es 1000 veces mayor que aquella para péptido 1-12 (SEC ID N.º: 15), haciéndose ambas determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial usando un Biocore 3000, en el que dicho anticuerpo es capturado primero a un nivel de 1000-2500 unidades de resonancia en una superficie de proteína A de un chip biosensor CM5 y péptido  $\beta$ -amiloide 1-40, 2-13 o 1-12 que se ha diluido en tampón HBS-EP se pasa sobre la superficie de anticuerpos capturados a concentraciones que varían desde 4-500 nM (es decir procedimiento B de los ejemplos).
- 25 4. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la región variable de cadena pesada humana se selecciona de:
- 30 -un gen V seleccionado del siguiente subgrupo de miembros de la familia VH3: VH3-48, VH3-21, VH3-11, VH3-7, VH3-13, VH3-74, VH3-64, VH3-23, VH3-38, VH3-53, VH3-66, VH3-20, VH3-9 y VH3-43
- un gen V seleccionado del siguiente subgrupo de miembros de la familia VH3: VH3-48, VH3-21 y VH3-11; o
- el gen VH3-48.
5. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es del isotipo IgG1.
- 35 6. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que carece de las funciones de a) activación del complemento por la ruta clásica y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
7. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 5 en el que los residuos 235 y 237 se han mutado a alanina.
- 40 8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
9. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad **caracterizada por** niveles de  $\beta$ -amiloide elevados o depósitos de  $\beta$ -amiloide elevados.
- 45 10. Un procedimiento para la elaboración de un anticuerpo terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho procedimiento comprende expresar un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo en una célula huésped.