

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 704**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2008** **E 08860577 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014** **EP 2222705**

54 Título: **Proteínas de unión a antígenos**

30 Prioridad:

11.12.2007 GB 0724185

04.04.2008 GB 0806230

10.04.2008 US 43839 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ALARD, PHILIPPE, MARC, LOUIS;
ELLIS, JONATHAN, HENRY;
FORD, SUSANNAH, KAREN;
GERMASCHEWSKI, VOLKER;
LEWIS, ALAN, PETER;
SODEN, PETER, ERNEST;
THOMAS, PAMELA, JOAN;
WATTAM, TREVOR, ANTHONY, KENNETH;
CATCHPOLE, IAN, RICHARD y
GOUGH, GERALD, WAYNE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 525 704 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

Proteínas de unión a antígenos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a proteínas de unión a antígenos, incluidos los anticuerpos, que se unen al péptido β -amiloide y en particular a péptido β -amiloide humano. La presente invención también se refiere a usos para tratar enfermedades o trastornos que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados, en particular enfermedad de Alzheimer y enfermedades o trastornos que afectan al ojo o al nervio óptico que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados, que incluyen degeneración macular senil, enfermedades de tipo glaucoma y formación de cataratas dependiente de β -amiloide, con proteínas de unión a antígenos que se unen al péptido β -amiloide, en particular al péptido β -amiloide humano. Otros aspectos de la presente invención serán patentes a partir de la descripción siguiente.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más habitual de declive cognitivo senil, que afecta a más de 12 millones de personas en todo el mundo (Citron M (2002) *Nat. Neurosci* 5, Supl 1055-1057). Las etapas más tempranas de la enfermedad se caracterizan por una pérdida progresiva de la memoria con un declive cognitivo y deficiencias del habla y el comportamiento asociados. En las etapas más tardías de la enfermedad, los pacientes desarrollan amnesia global y presentan una función motora muy reducida. La muerte habitualmente se produce 9 años después del diagnóstico y a menudo está asociada a otras afecciones, habitualmente neumonía (Davis K.L. y Samules S.C. (1998) en *Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders*, editores Enna S.J. y Coyle J.T. (McGraw-Hill, Nueva York páginas 267-316)). Los tratamientos actuales representan estrategias sintomáticas, que se centran en aliviar la deficiencia cognitiva y mejorar los síntomas del comportamiento asociados a la etiología de la enfermedad en curso. En la práctica, estos tratamientos proporcionan únicamente un beneficio cognitivo de corta duración ya que se ha reseñado que el nivel de deficiencia cognitiva dura únicamente hasta 2 años. El potencial de una terapia que modifique la enfermedad que ralentice y posiblemente detenga la progresión de la enfermedad es enorme. Dichas estrategias proporcionarían mejoras radicales y mantenidas en la calidad de vida de los pacientes y de forma muy importante sus cuidadores al igual que reduciría los tremendos costes sanitarios globales de esta enfermedad.

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer actualmente se basa en una combinación de pruebas físicas y mentales que llevan al diagnóstico de una posible o probable enfermedad de Alzheimer aunque se están investigando biomarcadores de diagnóstico y de obtención de imágenes (Sonnen y col. (2007) *Expert Rev Neurotherapeutics* 7(8): 1021-1028; Lockhart y col. (2007) *Brain* 130: 2607-2615). Post mortem la enfermedad se confirma por marcadores neurológicos bien caracterizados en el cerebro, que incluyen el depósito de A β en placas parenquimáticas y en los vasos cerebrales, formación intraneuronal de ovillos neurofibrilares, pérdida de sinapsis y pérdida de subpoblaciones neuronales en regiones específicas del cerebro (Terry, RD (1991) *J Neural Trans Supl* 53: 141-145).

Una ingente cantidad de indicios genéticos, histológicos y funcionales sugieren que el péptido β -amiloide (A β) es clave en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, D. J. (2001) *Physiological Reviews* 81: 741-766) aunque recientemente queda menos claro si los depósitos de A β que se observan en el examen post mortem son la causa real del declive cognitivo (Ferreira ST (2007) *Life* 59(4-5): 332-345). Se sabe que A β se produce mediante la escisión de la proteína precursora de β -amiloide (también conocida como APP) mediante una enzima aspartil proteasa conocida como BACE1 (también conocida como β -secretasa, Asp2 o Memapsin-2) (De Strooper, B. y König, G. (1999) *Nature* 402: 471-472). Además de los depósitos parenquimáticos y vasculares, se ha planteado la hipótesis de que las formas oligoméricas solubles de A β contribuyen al inicio de la EA y pueden afectar a la función neuronal inicialmente al impedir la función sináptica (Lambert y col. (1998) *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 95 : 6448-6453; Kaye y col. (2003) *Science* 300:486-489; Cheng y col. (2007) *J Biol Chem* 282(33): 23818-23828; Ferreira y col. (2007) *Life* 59:332-345). Aunque las placas de amiloide insolubles se encuentran de forma temprana en la EA y en la deficiencia cognitiva (MCI), los niveles de agregados de A β soluble (algunas veces denominados oligómeros o ligandos con capacidad de difusión derivados de A β (ADDL)) también están aumentados en estos individuos, y los niveles de A β soluble presentan una mejor correlación directa con la degeneración neurofibrilar y con 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). Además, estos oligómeros pueden representar precursores de la vía de la formación fibrilar y su eliminación o neutralización puede evitar los efectos tóxicos y la formación fibrilar (Ferreira ST (2007) *Life* 59(4-5): 332-345; Gong Y (2003) *PNAS* 100:10417-10422). A pesar de estos hallazgos, la A β 42 muy amiloidógena y las formas truncadas en el extremo amino A β x-42 son las especies predominantes de A β que se encuentran tanto difusas como en las placas seniles (Iwatsubo, T (1994) *Neuron*. 13:45-53, Gravina, SA (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7013-7016) y los niveles relativos de A β 42 parecen ser no solo un biomarcador de EA sino también un regulador clave de la agregación de A β en la formación de placas de amiloide. Se ha demostrado que 42 se agrega más fácilmente que otras formas de A β *in vitro* (Jarrett, JT (1993) *Biochemistry* 32: 4693-4697) y por ello se ha implicado a la A β 42 como molécula de inicio en la patogénesis de la EA (Younkin SG, (1998) *J. Physiol. (Paris)*. 92: 289-292). Aunque la A β 42 es habitualmente un producto minoritario en el

metabolismo de APP, unas pequeñas variaciones en su producción están asociadas a unos efectos considerables sobre el depósito de A β y por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que la reducción de A β 42 por sí sola puede ser una forma eficaz de tratar la EA (Younkin SG, (1998) *J. Physiol. (Paris)*. 92: 289–292; Levites y col. (2007) *J Clin Invest*. 116(1): 193-201). En apoyo de esto, se ha reseñado que las mutaciones en la proteína precursora amiloide (APP) y en los genes de presenilina aumentan predominantemente los niveles relativos de A β 42 y que por lo tanto acortan el tiempo hasta el inicio de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Selkoe D.J., Podlisny M.B. (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3: 67-99). Debería recalarse sin embargo, que la velocidad de la deposición de amiloide también depende de los niveles de amiloide globales, del catabolismo y de la eficacia del aclaramiento de A β del SNC que se ha demostrado que se ve influido negativamente por la edad y por niveles de amiloide elevados como los que se encuentran en la EA (Deane y col. (2005) *J Neurosci* 25(50):11495-11503; Wang y col. (2006) *Drug Discovery Today* 11(19/20): 931-938). En cuanto a esto, cada vez es más patente que el transporte del A β entre el sistema nervioso central (SNC) y el plasma desempeña un papel principal en la regulación de los niveles de amiloide en el cerebro (Shibata, y col. (2000) *J Clin Invest* 106 : 1489-1499), donde el A β se transporta rápidamente desde el SNC al plasma mediante mecanismos de transporte tales como LRP-1 y donde el A β se importa rápidamente desde el plasma al SNC mediante la unión a RAGE (Zlokovic BV (2004) *J Neurochem* 89: 807-811). Por lo tanto, se está desarrollando la vacunación activa con péptidos A β o la administración pasiva de anticuerpos específicos contra A β que se unen a A β periférico y que por lo tanto alteran el equilibrio dinámico entre el plasma, el CSF y el SNC. De hecho, actualmente hay numerosos estudios que han demostrado que ambas estrategias pueden disminuir los niveles de A β , reducir la patología por A β y en algunos casos proporcionar un beneficio cognitivo en diversos modelos transgénicos de amiloidosis. También se han realizado estudios limitados en especies superiores (Lemere, CA (2004) *Am J Pathology* 165: 283-297; Gandy, S (2004) *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18: 44:46).

Se han generado modelos animales de deposición de amiloides que hiperexpresan transgenes humanos mutantes en ratones. Los ratones que hiperexpresan transgenes de APP humanos únicos habitualmente desarrollan depósitos de β -amiloide de tipo placa cerebral a partir de 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 portan los transgenes tanto de APP humana mutante como de presenilina-1 (PS-1) habitualmente desarrollan depósitos de β -amiloide de tipo placas cerebrales desde a partir de los 2 meses de edad (Kurt M.A. y col., (2001) *Exp.Neurol.* 171: 59-71; McGowan E. y col., (1999) *Neurolbiol. Dis.* 6: 231-244). Estas considerables diferencias biológicas entre los diversos modelos de ratones transgénicos que se han usado han hecho que sea difícil comparar la farmacología y la eficacia de las diferentes estrategias. No existe un consenso real en la técnica sobre cómo funcionan realmente las inmunoterapias dirigidas contra β -amiloide y sus diversas formas. Es muy probable que los diferentes anticuerpos con diferentes propiedades de unión tengan resultados variables en esos modelos animales. También parece razonable que los anticuerpos pueden actuar mediante múltiples mecanismos y que los diferentes modos de acción que se han descrito no se excluyan los unos a los otros (Levites y col. (2007) *J Clin Invest*. 116(1): 193-201).

La primera inmunoterapia dirigida contra el amiloide cerebral en clínica fue Elan/Wyeth's AN-1792, una vacuna activa. Este tratamiento se terminó cuando se desarrollaron signos clínicos que eran coherentes con la meningoencefalitis. Los análisis de subgrupo sugirieron que el tratamiento ralentizaba el declive de la función cognitiva (*Nature Clin Pract Neurol* (2005) 1:84-85). Los análisis post-mortem de los pacientes también mostraron indicios de aclaramiento de placas (Gilman S. y col., (2005) *Neurology* 64 (9) 1553-1562).

Actualmente se está desarrollando Bapineuzumab (AAB-001, Elan/Wyeth), un anticuerpo monoclonal pasivo.

Otras enfermedades o trastornos que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados incluyen deficiencia cognitiva leve (Kelley BJ (2007) *Neurologic Clinics* 25 (3), 577-609), hemorragia cerebral hereditaria con β -amiloidosis del tipo holandés, angiopatía β -amiloide cerebral y diversos tipos de demencias neurodegenerativas, tales como las asociadas a la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, degeneración basal cortical y enfermedad de Alzheimer del tipo con cuerpos de Lewis (Mollenhauer B (2007) *J Neural Transm* publicada en internet el 23 de febrero de 2007, van Oijen, M *Lancet Neurol.* 2006 5:655-60), síndrome de Down (Mehta, PD (2007) *J Neurol Sci.* 254:22-7), degeneración macular senil (AMD) (Johnson LV y col. (2002) *PNAS USA* 99: 11830-11835; Anderson DH y col. (2004) *Exp Eye Res* 78: 243-256), enfermedades de "tipo glaucoma" (Guo L y col. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13444-13449) y formación de cataratas dependiente de β -A β (Goldstein LE y col. (2003) *Lancet* 361: 1258-1265; Li G y col. (2003) *Mol Vision* 9: 179-183).

La degeneración macular senil (AMD) es la causa principal de ceguera en el mundo desarrollado. Existen dos presentaciones clínicas principales de AMD. La AMD atrófica (seca) que se caracteriza por la degeneración del epitelio pigmentario retiniano (RPE) y la neurorretina. Las etapas más tempranas de la AMD atrófica se asocian a la formación de drusen, bajo la capa celular del RPE. La AMD atrófica temprana puede progresar hasta la etapa final de la enfermedad en la que el RPE degenera completamente y forma áreas claramente demarcadas de atrofia del RPE en la región de la macula: "atrofia geográfica". En esta forma de la enfermedad, la degeneración del RPE provoca la muerte secundaria de los bastones y conos maculares y en estos casos, esto provoca una grave pérdida de visión senil. Una proporción de los pacientes de AMD desarrollan lo que puede considerarse una forma diferente o una complicación adicional de la enfermedad. Aproximadamente el 10-20 % de los pacientes de AMD desarrollan neovascularización de las coroides, (CNV). Cuando esto sucede, la forma de la enfermedad se conoce como "AMD húmeda" y esta puede asociarse con algunas de las pérdidas de visión más graves. En la AMD húmeda, crecen nuevos vasos de las coroides a través de roturas en la membrana de Bruch y proliferan hacia el interior y bajo el

RPE y la neurorretina. En los casos habituales, se desarrolla la AMD en el ojo antes de que se desarrolle la forma húmeda, sin embargo, en ocasiones poco frecuentes, la forma neovascular puede desarrollarse en ausencia de un anterior desarrollo de la forma atrófica. En ambas formas de la enfermedad, se produce una pérdida de visión debido a la muerte de las células fotorreceptoras, aunque en la AMD húmeda el sangrado interno de los vasos permeables que se forman durante la CNV también provoca la pérdida de visión. En cuanto al tratamiento para la AMD se ha conseguido algún progreso en el desarrollo de tratamientos novedosos para paliar algunos de los aspectos de la AMD húmeda, en particular la reducción del sangrado de los vasos permeables provocados por la CNV mediante diversas moléculas que inhiben o bien VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) o la ruta de la señalización del receptor VEGF. Sin embargo, actualmente no hay ningún medio definitivo de tratamiento para la forma atrófica de AMD que es muy dominante ni para evitar la progresión de la AMD seca temprana o bien a una atrofia geográfica o bien a AMD húmeda, (Petrukhin K (2007) Expert Opin Ther Targets 11: 625-639)

Aunque los mecanismos exactos que provocan la producción de A β en RPE y el mecanismo o mecanismos exactos por los que actúa A β para influenciar la AMD no se comprenden completamente, los indicios implican que el aclaramiento del A β mediante agentes que se unen y que potencialmente neutralizan o solamente eliminan el A β pueden proporcionar una vía posible de aclarar el drusen en la AMD, reduciendo la activación de complemento en la AMD, reduciendo la atrofia del RPE y potencialmente reduciendo la inducción de la expresión de VEGF en el RPE y su localización en niveles elevados alrededor del drusen. Dicho tratamiento podría por lo tanto proporcionar medios de prevenir, retrasar, atenuar o invertir la pérdida de visión debido a la AMD y su progresión a atrofia geográfica y/o AMD exudativo. Esto puede lograr que el drusen contenga niveles menores de A β y/o A β local en el entorno que rodea el RPE y así interferir tanto en la etapa temprana como tardía de la AMD y tratar el declive celular subyacente que provoca la pérdida de visión.

Algunos datos publicados recientemente han arrojado luz sobre la interacción de las proteínas de complemento y amiloide beta en la generación de la AMD (Wang, J. y col., (2008) J. Immunol. 181: 16651-6). Se ha demostrado que el amiloide beta se une al factor de complemento I, el cofactor que con el factor H es responsable de la descomposición de la proteína de complemento I C3 a partir de la forma C3b produciendo su forma inactiva, iC3b, (Wang, J. y col., 2008). Se sugirió que los resultados del estudio *in vitro* recientemente publicado apoyaban la hipótesis de que el amiloide beta activa el sistema de complemento I del drusen bloqueando la función del factor de complemento I provocando una inflamación crónica de menor grado en los tejidos subretinianos; relacionando así cuatro de los factores asociados al desarrollo de la AMD: inflamación, activación de complemento, depósito de amiloide beta y drusen, (Wang, J. y col., 2008). Anteriormente nunca se habían documentado estos indicios directos del efecto de amiloide beta en la activación de la ruta de complemento alternativa puede potencialmente competir con el factor alternativo H por la unión al factor de complemento I, (Wang, J. y col., 2008).

"Enfermedades de tipo glaucoma" es una expresión que se usa para un grupo de enfermedades que pueden provocar daños en el nervio óptico ocular y provocar ceguera. Es una causa principal de ceguera en el mundo provocada en último extremo por una presión intraocular aumentada (IOP) y una menor agudeza visual. La relación entre la IOP y cómo esto provoca apoptosis de las células del ganglio retiniano (RGC) no se comprende bien. Una IOP elevada por sí sola puede inducir apoptosis (Cordeiro M F y col. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101:13352-13356; Quigley H A y col. (1995) Invest Ophthalmol Visual Sci 36:774-786) pero no es en sí misma la única causa de muerte celular en las neuronas ópticas. Además, se ha observado que la visión puede continuar deteriorándose incluso tras la normalización de la IOP tras el tratamiento con agentes que reducen la presión ocular (Oliver JE y col. (2002) Am J Ophthalmol 133:764-772).

Recientemente se han publicado reseñas que relacionan los potenciales efectos citotóxicos del β -amiloide con la apoptosis de las RGC en el glaucoma (McKinnon SJ y col. (2002) Invest Ophthalmol Visual Sci 43:1077-1087). En los modelos animales de glaucoma se ha demostrado que la proteasa caspasa-3 está activada en las RGC lo que provoca un procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide (APP) mediante la caspasa-3 que genera fragmentos potencialmente tóxicos de APP que incluyen β -amiloide (McKinnon y col. (2002); Cheung ZH y col. (2004) Mol Cell Neurosci 25:383-393). Se ha demostrado que, entre otras células, las RGC expresan APP y esto por lo tanto parece ser una fuente plausible de β -amiloide. Tanto los niveles elevados de APP y como los niveles de β -amiloide elevados se han relacionado con la activación de la caspasa-3 aunque esto se ha observado principalmente en los sistemas *in vitro*. No está claro si los niveles de APP en las RGC están también aumentados en el glaucoma contribuyendo así a la generación incluso de más β -amiloide en un mecanismo de retroalimentación positiva. Incluso más recientemente, se ha sugerido la implicación de β -amiloide en la apoptosis de las RGC en un modelo de rata de glaucoma (Guo y col. (2007)). Se analizaron diversos agentes contra el β -amiloide o contra la producción de β -amiloide y se demostró una reducción de la muerte de las células del ganglio retiniano *in vivo* con un posible efecto potenciador cuando los tres tratamientos se usaron juntos. El efecto mayor se observó al usar un anticuerpo contra β -amiloide que casi fue equivalente al efecto observado con los tres agentes juntos.

Aunque los mecanismos exactos que provocan la producción de β -amiloide en las RGC y la relación con la IOP no se entienden completamente, los indicios implican que el aclaramiento β -amiloide mediante los agentes que se unen y potencialmente neutralizan o solamente eliminan el β -amiloide pueden proporcionar un vía posible de evitar la apoptosis de las RGC en el glaucoma y por lo tanto proporcionar un medio de retrasar, atenuar o invertir la pérdida de visión en el glaucoma. Esto puede lograr reducir los niveles de β -amiloide en las RGC y el entorno que las rodea y así paliar el declive celular subyacente que provoca la pérdida de visión.

La β -amiloide puede desempeñar un papel en otras enfermedades oculares y se ha asociado a la formación de cataratas supranucleares especialmente en las que se observan en pacientes de EA y los componentes de la vía de generación y procesamiento del A β están presentes en el cristalino (Goldstein LE, y col., (2003); Li G, y col., (2003)). Las estrategias terapéuticas que se describen para la intervención en la AMD y en las enfermedades de tipo glaucoma pueden por lo tanto aplicarse a la prevención de la formación de cataratas dependiente de A β .

El documento WO 2008/110885 se refiere a procedimientos de tratar enfermedades oftálmicas con inhibidores dirigidos contra el péptido β -amiloide. Específicamente, se describe el anticuerpo 6G que se une a un epítipo de A β 1-40 que parece incluir 25-34 y 40. El documento WO 2004/071408 describe anticuerpos aislados, o fragmentos de los mismos, que son variantes humanizadas de anticuerpo 266 murino que se ha reivindicado que son útiles para el tratamiento o la prevención de afecciones y enfermedades asociadas con A β , incluida la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, angiopatía cerebral amiloide y declive cognitivo leve. El documento WO 2003/076455 describe anticuerpos contra el sitio de escisión de β -secretasa de A β PP y su uso en un procedimiento de inhibición de la formación de amiloide β . El documento WO 2008/110885 describe anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido β -amiloide para el tratamiento de enfermedades oftalmológicas tales como degeneración macular senil. El documento EP 0 683 234 describe anticuerpos que tienen especificidad de unión por β -amiloide o derivados del mismo, actuando el β -amiloide como un inmunógeno, o anticuerpos monoclonales que reconocen el extremo N terminal, el extremo C terminal o la porción central, respectivamente, de β -amiloide.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tienen la secuencia establecida en SEC ID N°: 65 y un dominio V_L que tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 71

En una realización se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide.

En una realización particular la proteína terapéutica de unión a antígenos reconoce un epítipo del péptido β -amiloide que contiene los restos 28-34 de β -amiloide.

En una realización más particular la proteína terapéutica de unión a antígenos reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-33 de β -amiloide.

En otra realización de la invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que está dentro de la región de restos 28-35 de β -amiloide.

En otra realización de la invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que está constituido por los restos 28-33, 28-34 o 28-35 de β -amiloide.

En una realización de la invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos que requiere los restos 32 y 33 de β -amiloide para la unión.

En una realización de la invención, la proteína terapéutica de unión a antígenos es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo.

En una realización de la presente invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos, que es una proteína de unión a antígenos, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo, que se une a péptido β -amiloide y que comprende las siguientes CDR:

CDRH1: VYYVH (SEC ID N°: 1)

CDRH2: RIDPENGETIYTPKFQD (SEC ID N°: 2)

CDRH3: SGY (SEC ID N°: 3)

CDRL1: RSSKSLHRNGITYLY (SEC ID N°: 4)

CDRL2: QMSNLAS (SEC ID N°: 5)

CDRL3: AQNLELWT (SEC ID N°: 6)

En otra realización de la invención se proporciona una proteína de unión a antígenos, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo que se une específicamente a péptido β -amiloide y comprende CDR que son variantes de las secuencias que se describen anteriormente.

Una variante de CDR incluye una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de la CDR mediante delección o sustitución de uno a varios aminoácidos de la CDR, o mediante adición o inserción de uno a varios aminoácidos en la CDR, o mediante una combinación de las mismas. La variante de CDR puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6

sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la CDR. La variante de CDR puede contener 1, 2 o 3 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la CDR. Las sustituciones de los restos aminoacídicos pueden ser sustituciones conservadoras, por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo alternativo. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por valina, o isoleucina. Las proteínas de unión a antígenos que comprenden una variante de CDR tendrán unas propiedades funcionales iguales o similares a las que comprenden las CDR que se describen anteriormente. Por lo tanto, las proteínas de unión a antígenos que comprenden una variante de CDR se unirán a la misma proteína o epítipo diana con una afinidad de unión igual o similar a la CDR que se describe en el presente documento.

Un anticuerpo ejemplar es el anticuerpo monoclonal murino 6F6. En una realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo humanizado o quimérico que comprende las CDR de 6F6 anteriormente identificadas. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender las regiones variables del anticuerpo murino 6F6, en concreto la SEC ID N°: 19 (V_H) y la SEC ID N°: 21 (V_L). Un ejemplo de un anticuerpo humanizado basado en murino 6F6 es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la SEC ID N°: 27 y una cadena ligera que tiene la SEC ID N°: 28.

En toda esta memoria descriptiva, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat tal y como se describe en Kabat y col.; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987. Por lo tanto, a continuación se definen las CDR de acuerdo con la invención:

CDR: Restos

CDRH1: 31-35

CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-97

CDRL1: 24-34

CDRL2: 50-56

CDRL3: 89-97

La IGHV1-24 (SEC ID N°: 13) es una secuencia germinal humana que es una estructura receptora adecuada para injertar las CDR de V_H. En un aspecto particular, la estructura de la cadena pesada receptora humana se deriva de IGHV1-24. En realizaciones alternativas de la presente invención, la estructura receptora humana comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada humana que tiene al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad entre las secuencias con la secuencia variable pesada de 6F6 murino en toda su longitud (excluyendo las secuencias de las CDR).

Para las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos, el término "idéntico" o "identidad de las secuencias" indica el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o dos de ácidos nucleicos cuando están alineadas de forma óptima y se comparan con inserciones o deleciones apropiadas. De forma alternativa, existe una identidad sustancial cuando los segmentos de ADN se hibridan en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la hebra. La identidad porcentual entre dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas que comparten las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones por 100), tomando en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación entre las secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe más adelante.

La identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP del paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70, o 80 y una ponderación de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de ponderación de los restos PAM120, una deducción por la longitud del hueco de 12 y una deducción por hueco de 4. Además, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el program GAP del paquete de software GCG, usando o una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación del hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

A modo de ejemplo, una secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a una secuencia de referencia tal como se describe, es decir ser 100 % idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero número de alteraciones de nucleótidos comparada con la secuencia de referencia, tal como al menos el 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica. Dichas alteraciones se seleccionan a partir del grupo constituido por al menos una deleción, sustitución, que incluye transición y transversión, o inserción de nucleótidos, y en las que dichas alteraciones pueden

producirse en las posiciones de los extremos 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea de forma individual entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número de nucleótidos total de la secuencia polinucleotídica de referencia por el porcentaje numérico de la identidad porcentual respectiva (dividido entre 100) y restando ese producto de dicho número de nucleótidos total de la secuencia polinucleotídica de referencia, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

en la que n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia e y es 0,50 para el 50 %, 0,60 para el 60 %, 0,70 para el 70 %, 0,75 para el 75 %, 0,80 para el 80 %, 0,85 para el 85 %, 0,90 para el 90 %, 0,95 para el 95 %, 0,98 para el 98 %, 0,99 para el 99 % o 1,00 para el 100 %, $\cdot$ es el símbolo del operador de la multiplicación, y en la que cualquier producto de x_n e y distinto de número entero se redondea al número entero inmediatamente inferior antes de restarlo de x_n .

De forma similar, una secuencia polipeptídica puede ser idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia tal como se describe en el presente documento, que es el 100 % idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia tal que el % de identidad sea inferior al 100 %, tal como al menos el 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica. Dichas alteraciones se seleccionan a partir del grupo constituido por al menos una delección, sustitución, que incluye sustitución conservadora y no conservadora, o inserción, de aminoácidos y en la que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones de los extremos amino o carboxi de la secuencia de referencia polipeptídica o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea de forma individual entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de los aminoácidos para un % de identidad dado se determina multiplicando el número total de aminoácidos de la secuencia polipeptídica codificado por la secuencia polipeptídica de referencia tal como se describe en el presente documento por el porcentaje numérico de la identidad porcentual respectiva (dividido entre 100) y después restando ese producto de dicho número total de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de referencia, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

en la que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia e y es 0,50 para el 50 %, 0,60 para el 60 %, 0,70 para el 70 %, 0,75 para el 75 %, 0,80 para el 80 %, 0,85 para el 85 %, 0,90 para el 90 %, 0,95 para el 95 %, 0,98 para el 98 %, 0,99 para el 99 % o 1,00 para el 100 %, $\cdot$ es el símbolo del operador de la multiplicación, y en la que cualquier producto de x_a e y distinto de número entero se redondea al número entero inmediatamente inferior antes de restarlo de x_a .

El % de identidad puede ser en toda la longitud de la secuencia.

Para construir una región V completa debe añadirse una estructura 4 al gen de V IGHV1-24 codificado por la línea germinal. Las secuencias 4 estructurales incluyen las codificadas por el minigen JH4 humano (Kabat):

YFDYWGGTLTVSS (SEC ID N°: 15)

La persona experta apreciará que un gen V y un gen J germinales no incluyen la secuencia codificante para toda la CDR3 de la cadena pesada. Sin embargo, en los anticuerpos de la invención, la CDR3 de la cadena pesada completa la proporcióna la inmunoglobulina donante. Por consiguiente, la combinación de un gen de VH tal como IGHV1-24, un minigen de JH tal como JH4, y un conjunto de CDR de la cadena pesada, tal como las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 (ensambladas de forma que imiten la región variable de la cadena pesada madura y completamente reordenada) es suficiente para definir una región variable de la cadena pesada de la invención.

La IGKV2-28 (SEC ID N°: 16) es una secuencia germinal humana que es una estructura receptora adecuada para injertar las CDR de V_L . En un aspecto particular, la estructura de la cadena ligera receptora humana se deriva de IGKV2-28. En realizaciones alternativas de la presente invención, la estructura receptora humana comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera humana que tiene al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad entre las secuencias con la secuencia variable ligera de 6F6 murino en toda su longitud (excluyendo las secuencias de las CDR).

Para construir una región V completa debe añadirse una estructura 4 al gen de V IGKV2-28 codificado por la línea germinal. Las secuencias 4 estructurales incluyen las codificadas por el minigen JK-1 humano (Kabat):

WTFGQGKTKVEIK (SEC ID N°: 18)

La persona experta apreciará que un gen V y un gen J germinales no incluyen la secuencia codificante para toda la CDR3 de la cadena ligera. Sin embargo, en los anticuerpos de la invención, la secuencia de la CDR3 la proporcióna la inmunoglobulina donante. Los dos primeros restos de los restos del minigen JK-1 entran dentro de la región de la CDR3. Para el minigen JK-1, estos restos son idénticos a los dos últimos restos de la CDRL3 de la cadena ligera (SEC ID N°: 6). Por consiguiente, la combinación de un gen de V_L tal como IGKV2-28, una FR4 tal como JK-1, y un

conjunto de CDR de cadena ligera, tal como las SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6 (ensambladas de forma que imiten la región variable de la cadena ligera madura y completamente reordenada) es suficiente para definir una región variable de la cadena ligera de la invención.

5 En una realización particular de la invención, la estructura de la cadena pesada receptora humana se deriva de IGHV1-24 y del minigen JH4 y la estructura de la cadena ligera receptora humana se deriva de IGKV2-28 y del minigen JK-1 que opcionalmente contiene una o más sustituciones de restos aminoacídicos basándose en los restos correspondientes que se encuentran en el dominio V_H del donante que tiene la secuencia: SEC ID N°: 19 y el dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N°: 21 que mantiene toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo donante por el péptido β -amiloide. Por 'sustancialmente toda la afinidad de unión' se quiere decir que el anticuerpo terapéutico presenta como máximo cinco veces, de forma más particular dos veces, una reducción en la afinidad de unión comparada con la del anticuerpo donante.

10 En una realización más particular de la invención la estructura de la cadena pesada receptora humana derivada de IGHV1-24 y JH4 tiene una o más, tal como de una a quince, de forma más particular de dos a quince, sustituciones de restos aminoacídicos que se seleccionan a partir de los siguientes restos (o sustituciones conservadoras de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Resto correspondiente en 6F6 murino
1	Q	E
5	V	Q
13	K	E
24	V	G
27	Y	F
28	T	N
29	L	I
30	T	K
37	V	L
40	A	L
41	P	T
48	M	I
66	R	K
67	V	A
69	M	L
71	E	V
75	T	S
76	D	N
93	A	V
94	T	S

En una realización más particular la estructura de la cadena pesada receptora humana que se deriva de IGHV1-24 y JH4 comprende los siguientes restos (o un sustituto conservador de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Sustitución del resto
13	K	E
24	V	G
27	Y	F
28	T	N
29	L	I
30	T	K
37	V	L
40	A	L
48	M	I
66	R	K
67	V	A
69	M	L
71	E	V
93	A	V
94	T	S

En una realización más particular de la invención la estructura de la cadena ligera receptora humana que se deriva de IGKV2-28 y JK-1 tiene una o más, tal como de una a cuatro, de forma más particular dos, sustituciones de restos aminoacídicos que se seleccionan a partir de los siguientes restos (o sustituciones conservadoras de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Sustitución del resto
8	P	A
11	L	N
43	S	P
63	S	T
64	G	S
100	Q (JK-1)	G
104	V (JK-1)	L

5

En una realización más particular de la invención la estructura de la cadena ligera receptora humana que se deriva de IGKV2-28 y JK-1 comprende los siguientes restos (o un sustituto conservador de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Sustitución del resto
11	L	N
64	G	S

La región variable de la cadena pesada puede combinarse con una región constante humana adecuada. La región variable de la cadena ligera puede combinarse con una región constante adecuada.

En una realización particular la proteína terapéutica de unión a antígenos de la presente invención es un anticuerpo o fragmento y/o derivado del mismo que esencialmente carece de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica de unión a antígenos o un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención la enfermedad relacionada con péptido β -amiloide es la enfermedad de Alzheimer. En otra realización de la invención la enfermedad relacionada con péptido β -amiloide es una enfermedad o trastorno que afecta al ojo o al nervio óptico que se caracteriza por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados. Específicamente, la enfermedad relacionada con péptido β -amiloide puede ser degeneración macular senil (AMD), glaucoma o formación de cataratas dependiente de β -amiloide.

En otra realización de la invención, la proteína terapéutica de unión a antígenos se administra combinada con un inhibidor de la vía de complemento, especialmente la vía de complemento alternativa, por ejemplo, pero sin exclusión otras estrategias contra complemento: factor de complemento H (CFH) o fragmentos del mismo, Receptor 1 de complemento soluble, (sCR1) o fragmentos del mismo, proteína cofactor de membrana soluble (MCP) y fragmentos del mismo, factor acelerador de la descomposición soluble (DAF) y fragmentos del mismo. En este contexto, un inhibidor de la vía de complemento es una molécula que actúa regulando negativamente la actividad de una vía de complemento, especialmente la vía de complemento alternativa.

En una realización adicional de la invención, la proteína terapéutica de unión a antígenos se administra combinada con un inhibidor de un activador de la vía de complemento, especialmente un inhibidor de un activador de la vía de complemento alternativa, por ejemplo, pero sin excluir otras estrategias de inhibición u otras dianas de la vía de complemento: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo de dominio, para neutralizar la actividad del factor de complemento D (CFD) o del factor de complemento B (CFB). El inhibidor peptídico de 13 restos del componente C3 del complemento, compstatina, y el anticuerpo contra el componente C5a del complemento, pexelizumab, también se considera que son inhibidores de los activadores de la vía de complemento en el contexto de la invención. En general, un inhibidor de un activador de la vía de complemento es un agente que inhibe o actúa de agonista, en algún grado, de una actividad biológica de un activador de complemento dado, de tal forma que el efecto sería regular negativamente la actividad de una vía de complemento, especialmente la vía de complemento alternativa.

Recientemente se han revisado estrategias terapéuticas que tienen como diana el complemento (Ricklin, D & Lambris, J. (2007) Nature Biotechnology 25: 1265-75) y las estrategias contra la vía de complemento que se describen en él podrían usarse todas potencialmente combinadas con un anticuerpo contra β -amiloide para proporcionar una estrategia terapéutica. Las estrategias contra complemento que se consideran incluyen: (i) inhibidores de contra proteasas, por ejemplo inhibidores de factor de complemento D, (ii) reguladores de complemento solubles, por ejemplo el receptor 1 de complemento soluble truncado, (iii) anticuerpos terapéuticos, por ejemplo contra el factor de complemento D o B, (iv) inhibidores de componentes de complemento, por ejemplo inhibidor de C5, y (v) antagonistas de los receptores, por ejemplo antagonistas del receptor C5a de molécula pequeña.

El inhibidor de la vía de complemento, o el inhibidor de un activador de la vía de complemento, puede administrarse de forma simultánea con la proteína terapéutica de unión a antígenos de la invención, o de forma secuencial, separada o de forma escalonada.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica de unión a antígenos tal como se define en el presente documento y un inhibidor de la vía de complemento o un inhibidor de un activador de la vía de complemento.

También se proporciona el uso de una proteína terapéutica de unión a antígenos o un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con péptido β -amiloide.

También se proporciona un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico del mismo que tiene una primera especificidad por β -amiloide, tal como un epítipo del péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide tal como se describe anteriormente, y una segunda especificidad por un activador de la vía de complemento.

También se proporciona una proteína de unión a antígenos de la invención, un anticuerpo de la invención, o un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico del mismo de la invención, para usar en el tratamiento de una enfermedad relacionada con péptido β -amiloide.

También se proporciona una proteína de unión a antígenos que compite con un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 27 y una cadena ligera que tiene la

secuencia que se expone en la SEC ID N°: 28 para unirse a β -amiloide en un ensayo ELISA.

La persona experta en la técnica aprecia que para que una proteína de unión a antígenos (proteína A de unión a antígenos) compita con un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 27 y una cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 28 (anticuerpo B) por un sitio de unión específico (β -amiloide), la proteína A de unión a antígenos debe estar presente en una cantidad suficiente como para que tenga un efecto en dicho ensayo. En una realización particular, proteína A de unión a antígenos y el anticuerpo B están presentes en cantidades equimolares. En otra realización, la presencia de proteína A de unión a antígenos reduce la unión de del anticuerpo B a β -amiloide en un ensayo ELISA en más del 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. En otra realización β -amiloide está unido a una placa de inmunoensayo en un ensayo ELISA. En otra realización la proteína A de unión a antígenos reduce la unión del anticuerpo B a β -amiloide unido a la placa, mientras que un control no específico contra β -amiloide no se une.

Se proporciona una proteína de unión a antígenos que se une a un péptido β -amiloide biotinilado en el extremo C que comprende los restos 24-35 (SEC ID N°: 10) o 28-39 (SEC ID N°: 11) de β -amiloide según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, estando dicho péptido unido a un chip sensor de estreptavidina.

Se proporciona una proteína de unión a antígenos, específicamente un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, que se une específicamente a β -amiloide y requiere al menos un resto en la región 28-35 de β -amiloide para su unión. En una realización preferida, la proteína de unión a antígenos además requiere al menos un resto que flanquea o un resto estructuralmente próximo a dicho al menos un resto en la región 28-35 de β -amiloide para su unión. Por consiguiente, la proteína de unión a antígenos puede requerir independientemente uno, dos, tres, cuatro, cinco o más restos que se seleccionan a partir del grupo constituido por 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 de β -amiloide, y restos flanqueantes o estructuralmente próximos.

La persona experta en la técnica puede identificar fácilmente dichas proteínas de unión a antígenos usando, por ejemplo, barrido de sustitución con alaninas en ensayos ELISA. Sobre esto, si la proteína de unión a antígenos requiere o no un resto en la región 28-35 de β -amiloide, o un resto flanqueante o estructuralmente próximo para su unión puede determinarse sustituyendo independientemente dicho resto de β -amiloide con alanina y comparando la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos con el péptido β -amiloide sustituido con alaninas con la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos del β -amiloide de tipo silvestre. Si es necesario o no un resto en la región 28-35 de β -amiloide se define por una reducción en la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos al péptido β -amiloide sustituido con alaninas comparada con la del péptido β -amiloide de tipo silvestre, en la que dicha reducción es superior a 1, 2, 3, 4 o 5 veces según se determina mediante mediciones de afinidad en Biacore o ELISA.

Además, un resto estructuralmente próximo en este contexto es un resto que está cercano en el espacio tridimensional al resto en cuestión y que se une a la proteína de unión a antígenos. La persona experta en la técnica aprecia que los epítomos de los antígenos pueden ser secuencias peptídicas o lineales o no lineales. En este último, el caso no lineal, aunque los restos son de regiones diferentes de la cadena peptídica, pueden estar cercanos en la estructura tridimensional del antígeno. Dichos restos estructuralmente próximos pueden determinarse a través de programas de modelos por ordenador o mediante estructuras tridimensionales obtenidas mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como cristalografía por rayos X.

En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, procedimiento que comprende expresar un polinucleótido que codifica el anticuerpo en una célula huésped.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una detección por transferencia Western de diversas formas de beta amiloide usando el anticuerpo 6F6 o 6E10 (anticuerpo específico para A β 1-16 humano; reactivo comercial, Eurogentec) y 5G5 (anticuerpo específico para A β 1-42; reactivo propio).

La Figura 2 muestra gráficos de barras que muestran la carga de placas en cortes de córtex e hipocampo de ratones transgénicos para hAPP después del tratamiento con 17 mg/kg o 33 mg/kg de 6F6 expresada en área % de placas corticales en términos de media $\pm$ error típico de la media.

La Figura 3 muestra gráficos de barras que muestran la carga de placas en cortes de córtex e hipocampo de ratones transgénicos para hAPP después del tratamiento con 17 mg/kg o 33 mg/kg de 6F6 expresada en número de placas por mm² en términos de media $\pm$ error típico de la media.

La Figura 4 muestra la detección de amiloide beta en la retina de ratones cfh -/-viejos

La Figura 5 muestra la reactividad cruzada de 6F6 con amiloide beta en la retina de ratones cfh -/-viejos

Descripción detallada de la invención

1. Proteínas de unión a antígenos

El término “proteína de unión a antígenos” tal como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras construcciones de proteínas, tal como dominios, específicamente los que son capaces de unirse a β -amiloide, tal como se describe más adelante.

1.1 Anticuerpos intactos

Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser “anticuerpos intactos”. Una proteína de unión a antígenos de la invención incluye un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo. Los anticuerpos intactos son habitualmente glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos ligeras. Excepto las IgM, los anticuerpos intactos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150KDa, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Habitualmente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente mientras que el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene enlaces disulfuro entre las cadenas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de 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 la cadena ligera

La persona experta en la técnica puede identificar fácilmente dichas proteínas de unión a antígenos usando, por ejemplo, barrido de sustitución con alaninas en ensayos ELISA. Sobre esto, si la proteína de unión a antígenos requiere o no un resto en la región 28-35 de β -amiloide, o un resto flanqueante o estructuralmente próximo para su unión puede determinarse sustituyendo independientemente dicho resto de β -amiloide con alanina y comparando la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos con el péptido β -amiloide sustituido con alaninas con la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos del β -amiloide de tipo silvestre. Si es necesario o no un resto en la región 28-35 de β -amiloide se define por una reducción en la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos al péptido β -amiloide sustituido con alaninas comparada con la del péptido β -amiloide de tipo silvestre, en la que dicha reducción es superior a 1, 2, 3, 4 o 5 veces según se determina mediante mediciones de afinidad en Biacore o ELISA.

Además, un resto estructuralmente próximo en este contexto es un resto que está cercano en el espacio tridimensional al resto en cuestión y que se une a la proteína de unión a antígenos. La persona experta en la técnica aprecia que los epítomos de los antígenos pueden ser secuencias peptídicas o lineales o no lineales. En este último, el caso no lineal, aunque los restos son de regiones diferentes de la cadena peptídica, pueden estar cercanos en la estructura tridimensional del antígeno. Dichos restos estructuralmente próximos pueden determinarse a través de programas de modelos por ordenador o mediante estructuras tridimensionales obtenidas mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como cristalografía por rayos X.

En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, procedimiento que comprende expresar un polinucleótido que codifica el anticuerpo en una célula huésped.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un anticuerpo terapéutico que comprende una cadena V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 24.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 26.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo terapéutico que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 27.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de un anticuerpo terapéutico que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 28.

En una realización más particular de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo terapéutico, polinucleótido que comprende la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 29.

En otra realización más particular de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo terapéutico, polinucleótido que comprende la secuencia que se expone en la SEC ID N°: 30.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una detección por transferencia Western de diversas formas de beta amiloide usando el anticuerpo 6F6 o 6E10 (anticuerpo específico para A β 1-16 humano; reactivo comercial, Eurogentec) y 5G5 (anticuerpo específico para A β 1-42; reactivo propio).

La Figura 2 muestra gráficos de barras que muestran la carga de placas en cortes de córtex e hipocampo de ratones transgénicos para hAPP después del tratamiento con 17 mg/kg o 33 mg/kg de 6F6 expresada en área % de placas

corticales en términos de media $\pm$ error típico de la media.

La Figura 3 muestra gráficos de barras que muestran la carga de placas en cortes de córtex e hipocampo de ratones transgénicos para hAPP después del tratamiento con 17 mg/kg o 33 mg/kg de 6F6 expresada en número de placas por mm² en términos de media $\pm$ error típico de la media.

5 La Figura 4 muestra la detección de amiloide beta en la retina de ratones cfh -/-viejos

La Figura 5 muestra la reactividad cruzada de 6F6 con amiloide beta en la retina de ratones cfh -/-viejos

Descripción detallada de la invención

1. Proteínas de unión a antígenos

10 El término "proteína de unión a antígenos" tal como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras construcciones de proteínas, tal como dominios, específicamente los que son capaces de unirse a β -amiloide, tal como se describe más adelante.

1.1 Anticuerpos intactos

15 Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser "anticuerpos intactos". Una proteína de unión a antígenos de la invención incluye un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo. Los anticuerpos intactos son habitualmente glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos ligeras. Excepto las IgM, los anticuerpos intactos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150KDa, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Habitualmente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente mientras que el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene enlaces disulfuro entre las cadenas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de 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 la 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 dividirse en cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. La IgG y la IgA pueden subdividirse a su vez en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4; e IgA1 y IgA2. Existen variantes de especies donde el ratón y la rata tienen al menos IgG2a, IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere especificidad de unión al anticuerpo, donde ciertas regiones presentan una variabilidad particular denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las porciones más conservadas de la región variable se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras comprenden cada uno cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas muy próximas mediante las regiones FR y con las CDR de la otra cadena contribuyen a la formación del sitio de unión de antígenos de anticuerpos. Las regiones constantes no están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero muestran diversas funciones efectoras tales como participación en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediante la unión al receptor Fc γ , semivida/tasa de aclaramiento mediante el receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente de complemento mediante el componente C1q de la cascada de complemento. Se ha reseñado que la región constante de IgG2 humana carece esencialmente de la capacidad de activar complemento por la ruta clásica o de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Se ha reseñado que la región constante de IgG4 humana carece de la capacidad de activar complemento por la ruta clásica y actúa de mediadora en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos únicamente de forma débil. Los anticuerpos que carecen esencialmente de estas funciones efectoras pueden denominarse anticuerpos "no líticos".

1.1.1 Anticuerpos humanos

45 Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser "anticuerpos humanos". Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante un número de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante el procedimiento de los híbridos usando líneas celulares de mieloma humanas o de heteromieloma de ratón y humana véase 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 colecciones de fagos o ratones transgénicos ambos de los cuales utilizan repertorios de regiones V humanas (véase Winter G, (1994), Annu. Rev. Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J. Immunol. methods 231, 11-23).

55 Actualmente se dispone de diversas cepas de ratones transgénicos en las que sus locus de inmunoglobulina murinos se han reemplazados por segmentos génicos de inmunoglobulina (véase Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14, 845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15,146-156). Tras la exposición a antígenos dichos ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos de los que

pueden seleccionarse anticuerpos de interés.

Particularmente interesante es el sistema de TrimerTM (véase Eren R y col., (1998) Immunology 93:154-161) en el que los linfocitos humanos se transplantan en ratones radiados, el sistema de anticuerpos linfocíticos seleccionado (SLAM, véase Babcook y col., PNAS (1996) 93:7843-7848) en el que los linfocitos humanos (o de otras especies) se introducen en un procedimiento de generación masiva conjunta de anticuerpos *in vitro* seguida de separación, dilución limitante y procedimiento de selección y el Xenomouse IITM (Abgenix Inc). Hay una estrategia alternativa disponible en Morphotek Inc que usa la tecnología del MorphodomaTM.

La tecnología de presentación en fagos puede usarse para producir anticuerpos humanos (y fragmentos del mismo), véase McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) y Griffiths EA y col. (1994) EMBO 13:3245-3260. De acuerdo con esta técnica se clonan los genes del dominio V del anticuerpo en marco o bien con un gen de proteínas de la cubierta o principal o secundaria de un bacteriófago filamentosos tal como M13 o fd y se presenta (habitualmente con la ayuda de un fago cooperador) como fragmento funcional de anticuerpos sobre la superficie de la partícula del fago. Las selecciones que se basan en las propiedades funcionales del anticuerpo consiguen la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. La técnica de presentación en fagos puede usarse para seleccionar anticuerpos específicos de antígeno de colecciones formadas por linfocitos B humanos extraídos de individuos que padecen una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o de forma alternativa de donantes humanos no inmunizados (véase Marks; J.Mol.Biol. 222, 581-597, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que comprenda un dominio Fc es necesario reclonar el fragmento derivado del fago presentado en un vector de expresión mamífero que comprenda las regiones constantes deseadas y que establezca líneas celulares con expresión estable.

La técnica de la maduración por afinidad puede usarse para mejorar la afinidad de unión. Esto puede lograrse por ejemplo por sustitución secuencial de las regiones H y L de la cadena V con variantes naturales y seleccionando en base a las afinidades de unión mejoradas (Marks; Bio/technol 10, 779-783 (1992). Actualmente también hay disponibles variantes de esta técnica tales como "sellado de epítopos" (documento WO 93/06213, Waterhouse; Nucl. Acids Res 21, 2265-2266 (1993)). Más recientemente se han obtenido anticuerpos madurados por afinidad mediante mutagénesis aleatoria de las regiones V o las CDR por ejemplo usando replicasas de ARN con tendencia a errores y la posterior selección de estas colecciones mediante técnicas de selección de presentación en ribosomas (Kopsidas G BMC Biotechnology. 7: 18, 2007).

1.1.2 Anticuerpos quiméricos y humanizados

Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser anticuerpos "quiméricos" o "humanizados". El uso de anticuerpos intactos no humanos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos comporta los actualmente bien establecidos problemas de la potencial capacidad inmunógena especialmente tras la administración repetida del anticuerpo: es decir, el sistema inmunitario del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como foráneo y desencadenar una respuesta neutralizadora. Además de desarrollar anticuerpos completamente humanos (véase en lo que antecede) se han desarrollado diversas técnicas en el transcurso de los años para superar estos problemas y generalmente conllevan reducir la composición de las secuencias de aminoácidos no humanas en el anticuerpo terapéutico humano a la vez que se mantiene la facilidad relativa de obtener anticuerpos no humanos de un animal inmunizado por ejemplo ratón, rata o conejo. En líneas generales, se han usado dos estrategias para lograr esto. La primera son los anticuerpo quiméricos, que generalmente comprenden un dominio variable no humano (por ejemplo de roedor tal como de ratón) fusionado a una región constante humana. Debido a que el sitio de unión de antígenos de un anticuerpo está localizado en 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 es capaz de realizar funciones efectoras tal como se describe más arriba. Los anticuerpos quiméricos habitualmente se producen usando procedimientos de recombinación de ADN. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo ADNc) se aísla y secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las regiones variables de las cadenas H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo ADN de las SEC ID N°: 19 y 21 que se describen anteriormente). Las células de hibridoma sirven de fuente típica de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se introduce en vectores de expresión que después se transfectan a células hospedadoras tales como *E.Coli*, células COS, células CHO, células PerC6 o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulínica obteniendo la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo la secuencia codificante de las 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). Así, en otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo quimérico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia: SEC ID N°: 19 y un dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N°: 21 fusionada a una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG por ejemplo IgG1).

La segunda estrategia conlleva la generación de anticuerpos humanizados en los que se reduce el contenido no humano del anticuerpo al humanizar las regiones variables. Dos técnicas de humanización han ganado popularidad. La primera es la humanización mediante injerto de CDR. Las CDR forman bucles cerca del extremo N del anticuerpo donde forman una superficie montada en un supercántigo que proporcionan las regiones estructurales. La especificidad de unión al antígeno del anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características

químicas de la superficie de sus CDR. Estas características a su vez son determinadas 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 restos que comprenden las CDR. Puede lograrse un gran descenso de la capacidad inmunógena injertando sólo las CDR de un anticuerpo no humano (por ejemplo murino) (anticuerpo "donante") sobre una estructura humana adecuada ("estructura receptora") y regiones constantes (véase 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 conseguir que se mantengan todas las propiedades de unión de antígenos y con frecuencia se encuentra que deben preservarse algunos restos estructurales del anticuerpo donante (que algunas veces se denominan "contramutaciones") en la molécula humanizada si debe recuperarse una afinidad de unión de antígenos significativa en la molécula humanizada (véase Queen C y col. (1989) *PNAS* 86, 10,029-10,033, Co, M y col. (1991) *Nature* 351, 501-502). En este caso, pueden elegirse regiones V humanas que muestran la mayor homología entre las secuencias (habitualmente 60 % o mayor) para el anticuerpo donante no humano a partir de una base de datos para proporcionar la estructura humana (FR). La selección de FR humanas puede realizarse o bien a partir de consensos humanos o a partir de anticuerpos humanos individuales. Cuando sea necesario, los restos clave del anticuerpo donante se introducen en la estructura receptora humana para conservar las conformaciones de las CDR. Pueden usarse los modelos por ordenador del anticuerpo para ayudar a identificar dichos restos estructuralmente importantes, véase el documento WO99/48523.

De forma alternativa, la humanización puede lograrse mediante un procedimiento de "chapado". Un análisis estadístico de regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas y murinas reveló que los patrones precisos de los restos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones superficiales individuales tienen una gran preferencia por un pequeño número de restos diferentes (véase 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 capacidad inmunógena de un Fv no humano sustituyendo los restos expuestos de sus regiones estructurales que difieren de las que habitualmente se encuentran en los anticuerpos humanos. Debido a que puede establecerse una relación directa entre la capacidad antigénica de las proteínas y la accesibilidad superficial, la sustitución de los restos superficiales puede ser suficiente para hacer que la región variable murina sea "invisible" para el sistema inmunitario humano (véase también Mark G.E. y col. (1994) in *Handbook of Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, páginas 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "chapado" porque únicamente se altera la superficie del anticuerpo, los restos estructurales no se alteran. Otras estrategias alternativas incluyen las que se describen en el documento WO04/006955 y el procedimiento de HumaneeringTM (Kalobios) que utiliza los sistemas de expresión bacterianos y produce anticuerpos que tienen una secuencia similar a la de la línea germinal humana (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics, enero de 2007, San Diego, California).

Para los expertos en la técnica será patente que el término "derivado" se pretende que defina no sólo la fuente en el sentido de que sea el origen físico del material sino que también define el material que estructuralmente idéntico al material pero que no tiene su origen en la fuente de referencia. Así, los "restos que se encuentran en el anticuerpo donante" no necesariamente tienen que haber sido purificados a partir del anticuerpo donante.

Está bien reconocido en la técnica que ciertas sustituciones de aminoácidos se considera que son "conservadoras". Los aminoácidos se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de sus cadenas laterales y las sustituciones dentro de estos 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:

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
Restos que influyen sobre la orientación de las cadenas	gly, pro
Aromáticas	trp, tyr, phe

1.1.3 Anticuerpos multiespecíficos y biespecíficos

Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser multiespecíficas es decir pueden unirse a más de un antígeno. En una realización particular, la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo derivado que tiene especificidades de unión por al menos dos epítopos

diferentes y también forma parte de la invención. Los procedimientos para preparar dichos anticuerpos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas H y cadenas L de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas H tienen especificidades de unión diferentes, véase Millstein y col., *Nature* 305 537-539 (1983), el documento WO93/08829 y Traunecker y col. *EMBO*, 10, 1991, 3655-3659. Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de diez estructuras de anticuerpos diferentes de las cuales sólo una tiene la especificidad de unión deseada. Una estrategia alternativa implica fusionar los dominios variables con las especificidades deseadas a la región constante de la cadena pesada que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la región CH1 que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican estas fusiones y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan a un organismo huésped adecuado. Sin embargo es posible insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas en un vector de expresión. En una estrategia preferida, el anticuerpo biespecífico está compuesto por una cadena H con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena H y cadena L, proporcionando 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 las proteínas terapéuticas al cerebro ha sido dificultada por la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB) y existe una barrera retiniana similar entre el ojo y la corriente sanguínea. Se han propuesto diversas estrategias cuando se desea administrar una proteína de unión a antígenos de la invención, tal como un anticuerpo de la invención o fragmento de anticuerpo de la invención, a través de una barrera biológica tal como la BBB para potenciar dicha administración cuando sea necesario y pueden ser aplicables estrategias similares para permitir cruzar la barrera retiniana.

Para obtener los nutrientes y factores necesarios de la sangre, la BBB posee algunos receptores específicos, que transportan compuestos de la sangre en circulación al cerebro. Los estudios han indicado que algunos compuestos como la insulina (véase Duffy KR y col. (1989) *Brain Res.* 420:32-38), transferrina (véase Fishman JB y col. (1987) *J. Neurosci* 18:299-304) y los factores de crecimiento de tipo insulina 1 y 2 (véase Pardridge WM (1986) *Endocrine Rev.* 7:314-330 y Duffy KR y col. (1986) *Metabolism* 37:136-140) atraviesan la BBB mediante transcitosis mediada por receptores. Los receptores de estas moléculas proporcionan así un medio potencial para que los anticuerpos terapéuticos de la invención accedan al cerebro usando los denominados anticuerpos "vectoriales" (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 (véase Friden PM y col. (1991) *PNAS* 88: 4771-4775 y Friden PM y col. (1993) *Science* 259: 373-377). Así, una estrategia potencial es producir un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico tal como se describe anteriormente en el que una primera especificidad sea hacia un epítipo del péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide tal como se describe anteriormente y una segunda especificidad hacia un receptor de transporte localizado en la BBB por ejemplo una segunda especificidad hacia el receptor de transporte de transferrina.

Otros anticuerpos biespecíficos previstos por la presente invención incluyen un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico del mismo que tiene una primera especificidad por β -amiloide y una segunda especificidad por un activador de la vía de complemento con el objetivo de inhibir su actividad, por ejemplo, pero sin excluir otros: un factor de complemento, tal como el factor de complemento D.

Las proteínas multiespecíficas de unión a antígenos de la invención incluyen proteínas que tienen una primera especificidad por β -amiloide, tal como un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide tal como se describe anteriormente, una segunda especificidad por un receptor de transporte situado en la BBB o en la barrera hematorretiniana y una tercera especificidad por un activador de la vía de complemento.

1.2 Fragmentos de anticuerpos y otras construcciones proteínicas, tales como dominios

En ciertas realizaciones de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un fragmento de unión a antígenos. Dichos fragmentos pueden ser fragmentos de unión de antígenos funcionales de anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos tales como fragmentos Fab, Fd, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv de los anticuerpos que se describen anteriormente. Los fragmentos que carecen de la región constante de IgG2 humana carecen esencialmente de la capacidad de activar complemento por la ruta clásica o de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Además dichos fragmentos se producen mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos por ejemplo mediante digestión con papaína (véase por ejemplo, el documento WO 94/29348) pero pueden producirse directamente a partir de células hospedadoras transformadas por vía recombinante. Para la producción de ScFv, véase Bird y col.; (1988) *Science*, 242, 423-426. Además, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse usando una variedad de técnicas de ingeniería tal como se describe más adelante.

Los fragmentos Fv parecen tener una menor energía de interacción de sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para estabilizar la asociación de los dominios V_H y V_L, se han enlazado con péptidos (Bird y col., (1988) *Science* 242, 423-426, Huston y col., *PNAS*, 85, 5879-5883), enlaces disulfuro (Glockshuber y col., (1990) *Biochemistry*, 29, 1362-1367) y mutaciones "knob in hole" (Zhu y col. (1997), *Protein Sci.*, 6, 781-788). Los fragmentos ScFv pueden producirse mediante procedimientos notorios para los expertos en la técnica véase Whitlow y col. (1991) *Methods companion Methods Enzymol*, 2, 97-105 y Huston y col. (1993) *Int. Rev. Immunol* 10, 195-217. Los ScFv pueden

producirse en células bacterianas tales como *E. Coli* pero más habitualmente se producen en células eucariotas. Una desventaja de los ScFv es la monovalencia del producto, que impide aumentar la avidéz debido a una unión polivalente, y a su corta semivida. Los intentos para solventar estos problemas incluyen (ScFv)₂ bivalentes producidos a partir de ScFv que contienen una cisteína adicional en el extremo C mediante acoplamiento químico (Adams y col. (1993) Can. Res 53, 4026-4034 y McCartney y col. (1995) Protein Eng. 8, 301-314) o mediante dimerización específica de sitio de los ScFv que contienen un resto cisteína en el extremo C no emparejado (véase Kipriyanov y col. (1995) Cell. Biophys 26, 187-204). De forma alternativa, puede forzarse a los ScFv a que formen multímeros acortando el enlazador peptídico a entre 3 y 12 restos formando "diacuerpos", véase Holliger y col. PNAS (1993), 90, 6444-6448. Reducir todavía más el enlazador puede provocar la formación de trímeros de ScFv ("triacuerpos", véase Kortt y col. (1997) Protein Eng, 10, 423-433) y tetrameros ("tetracuerpos", véase Le Gall y col. (1999) FEBS Lett, 453, 164-168). La construcción de moléculas bivalentes de ScFv también puede lograrse mediante fusión genética con motivos de dimerización de proteínas formando "minianticuerpos" (véase Pack y col. (1992) Biochemistry 31, 1579-1584) y "minicuerpos" (véase Hu y col. (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061). Los tandems de ScFv-Sc-Fv ((ScFv)₂) también pueden producirse enlazando dos unidades de ScFv mediante un tercer péptido enlazador, véase Kurucz y col. (1995) J. Immunol. 154, 4576-4582. Los diacuerpos biespecíficos pueden producirse a través de la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadenas únicas constituidas por el dominio V_H de un anticuerpo conectado mediante un enlazador corto al dominio V_L de otro anticuerpo, véase Kipriyanov y col. (1998), Int. J. Can 77, 763-772. La estabilidad de dichos diacuerpos biespecíficos puede potenciarse mediante la introducción de puentes disulfuro o mutaciones "knob in hole" tal como se describe anteriormente o mediante la formación de diacuerpos monocatenarios (ScDb) en los que se conectan dos fragmentos ScFv híbridos a través de un péptido enlazador véase Kontermann y col. (1999) J. Immunol. Methods 226 179-188. Las moléculas biespecíficas tetravalentes están disponibles por ejemplo mediante la fusión de 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. De forma alternativa, se han creado moléculas biespecíficas tetravalentes mediante la fusión de diacuerpos monocatenarios biespecíficos (véase Alt y col., (1999) FEBS Lett 454, 90-94. También pueden formarse moléculas biespecíficas tetravalentes más pequeñas mediante la dimerización o bien de tandems de ScFv-ScFv con un enlazador que contiene un motivo de hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller y col. (1998) FEBS Lett 432, 45-49) o una molécula monocatenaria que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo (V_H y V_L) en una orientación que evita el emparejamiento intramolecular (diacuerpo en tandem, véase Kipriyanov y col., (1999) J. Mol. Biol. 293, 41-56). Pueden crearse fragmentos biespecíficos F(ab')₂ mediante acoplamiento químico de fragmentos Fab' o mediante heterodimerización a través de cremalleras de leucina (véase Shalaby y col., (1992) J. Exp. Med. 175, 217-225 y Kostelny y col. (1992), J. Immunol. 148, 1547-1553). También hay disponibles dominios V_H y V_L aislados, véanse los documentos US 6.248.516; US 6.291.158; US 6.172.197. La frase "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere a un dominio variable de anticuerpo (V_H, V_{HH}, V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítipo de forma independiente de una región o dominio V diferente. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homomultímero o heteromultímero) con otras regiones variables o dominios variables diferentes, donde las otras regiones o dominios no son necesarios para unirse a los antígenos mediante el único dominio variable de inmunoglobulina (es decir, donde el dominio variable único de inmunoglobulina se une a un antígeno de forma independiente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio único" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" que es capaz de unirse a un antígeno tal y como se usa el término en el presente documento. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de un anticuerpo único de otras especies tales como roedores (por ejemplo, tal y como se describe en el documento WO 00/29004, dAb de V_{HH} de tiburón nodriza y camélidos. Los V_{HH} de camélidos son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies que incluyen, camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos con cadenas pesadas naturalmente carentes de cadenas ligeras. Tales dominios V_{HH} pueden humanizarse de acuerdo con técnicas estándar disponibles en la técnica, y dichos dominios se considera todavía que son "anticuerpos de dominio único" de acuerdo con la invención. Tal como se usa en el presente documento "V_H incluye dominios V_{HH} de camélidos.

También puede proporcionarse un fragmento de unión a antígenos mediante ordenación de una o más de las CDR en supercántigos proteínicos no correspondientes a anticuerpos tales como un dominio. Un dominio puede unirse específicamente a un antígeno o epítipo de forma independiente de una región variable o dominio diferente. Este puede ser un anticuerpo de dominio, tal como se describe anteriormente, o puede ser un dominio que sea un derivado de un supercántigo que se selecciona a partir del grupo constituido por CTLA-4, lipocalina, SpA, un Afficuerpo, un avimero, GroEl, transferrina, GroES fibronectina/adnectina, que se han sometido a bioingeniería de proteínas para obtener la unión a un antígeno distinto del ligando natural.

En este contexto, el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene estructura terciaria, independiente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las diferentes propiedades funcionales de las proteínas, y en muchos casos pueden añadirse, eliminarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable único" es un dominio de un polipéptido plegado que comprende secuencias características de los dominios variables de los anticuerpos. Por lo tanto incluye, dominios variables de anticuerpos completos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables

de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que han sido truncados o que comprenden extensiones en el extremo N o C, así como fragmentos plegados de dominios variables que mantienen al menos la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.

1.3 Anticuerpos heteroconjugados

- 5 Los anticuerpos heteroconjugados son derivados que también forman una realización de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente que se forman usando cualesquiera procedimientos de reticulación convenientes. Véase el documento US 4.676.980.

1.4 Otras modificaciones.

- 10 Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos receptores Fc (FcγR) actúa de mediadora de las funciones efectoras del anticuerpo que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fijación de complemento, fagocitosis y semivida/aclaramiento del anticuerpo. Pueden realizarse diversas modificaciones a la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad efectora que se desee. En particular, las regiones constantes humanas que esencialmente carecen de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incluye la
- 15 región constante de IgG4, la región constante de IgG2 y las regiones constantes de IgG1 que contienen mutaciones específicas como por ejemplo mutaciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y/o 322 que se describen en los documentos EP0307434 (WO8807089), EP 0629 240 (WO9317105) y WO 2004/014953. Se ha descrito por separado que las mutaciones en los restos 235 o 237 dentro del dominio CH2 de la región constante de la cadena pesada (numeración según Kabat; sistema de indexado EU) reducen la unión a FcγRI, FcγRII y la unión a
- 20 FcγRIII y por lo tanto reducen 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 describen la implicación de algunos de estos restos en el reclutamiento o mediación de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Morgan y col., 1995;
- 25 Xu y col., Cell. Immunol. 2000; 200:16-26; Hezareh y col., J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168). Por lo tanto, los restos 235 y 237 se han mutado ambos a restos de alanina (Brett y col. Immunology 1997, 91; 346-353; Bartholomew y col. Immunology 1995, 85; 41-48; y documento WO9958679) para reducir los efectos tanto de mediación por complemento como por FcγR. Los anticuerpos que comprenden estas regiones constantes pueden denominarse anticuerpos "no líticos".

- 30 Se puede incorporar un epítipo de unión de receptores de rescate al anticuerpo para aumentar su semivida en suero véase el documento US 5.739.277.

- Actualmente hay cinco receptores Fcγ humanos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y col., (2001) J. Biol. Chem 276, 6591-6604 demostraron que un conjunto común de restos de IgG1 está implicado en la unión de todos los FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de este conjunto común. Un
- 35 grupo de restos de IgG1 redujo la unión a todos los FcγR cuando se alteraron a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y arracimados cerca de la región de bisagra CH1 y CH2. Aunque FcγRI utiliza únicamente el conjunto común de restos de IgG1 para su unión, FcγRII y FcγRIII interactúan con restos diferentes además de los del conjunto común. La alteración de algunos restos redujo la unión solo a FcγRII (por ejemplo Arg-292) o a 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 mejoró la unión a FcγRII pero no afectó a la unión a FcγRIII). Otras variantes mostraron una unión mejorada 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). Para FcγRIIIa, las mejores variantes de unión de IgG1 habían combinado sustituciones con alanina en Ser-298, Glu-333 y Lys-334.
- 40 Se cree que el receptor neonatal FcRn está implicado en proteger a las moléculas de IgG de la degradación y así potenciar la semivida en suero y la transcitosis entre tejidos (véase Junghans R.P (1997) Immunol. Res 16. 29-57 y Ghetie y col. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766). Se determinó que los restos de IgG1 humana que interactuaban 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 anterior.

- 50 En una realización particular el anticuerpo terapéutico esencialmente carece de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En una realización más particular la presente invención proporciona anticuerpos terapéuticos de la invención que tiene uno cualquiera (o más) de los cambios de los restos que se detallan anteriormente para modificar la semivida/aclaramiento y/o las funciones efectoras tales como ADCC y/o citotoxicidad dependiente de complemento
- 55 y/o lisis por complemento.

En un aspecto adicional de la presente invención el anticuerpo terapéutico tiene una región constante del isotipo IgG1 humano con sustituciones de alanina (u otras que la alteren) en las posiciones 235 (por ejemplo L235A) y 237 (por ejemplo G237A) (numeración de acuerdo con el esquema EU que se detalla en Kabat).

Otros derivados de la invención incluyen variantes de glucosilación de los anticuerpos de la invención. Se sabe que la glucosilación de los anticuerpos en posiciones conservadas de sus regiones constantes tiene un profundo efecto sobre la función del anticuerpo, en particular las funciones efectoras tales como las que se describen anteriormente, véase por ejemplo, Boyd y col. (1996), Mol. Immunol. 32, 1311-1318. Se contemplan las variantes de glucosilación de los anticuerpos terapéuticos de la presente invención en las que se añade, elimina o modifica uno o más restos carbohidratados. La introducción de un motivo asparragina-X-serina o asparragina-X-treonina crea un sitio potencial para la unión enzimática de restos carbohidratados y puede usarse por lo tanto para manipular la glucosilación de un anticuerpo. En Raju y col. (2001) Biochemistry 40, 8868-8876 se aumentó la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG a través de un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa-2,3-sialiltransferasa. Se cree que al aumentar la sialilación termina se aumenta la semivida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, al igual que la mayoría de las glucoproteínas, habitualmente se producen en la naturaleza en forma de una mezcla de glucoformas. Esta mezcla es particularmente obvia cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, en particular de mamífero. Se ha desarrollado una variedad de procedimientos para fabricar glucoformas definidas, véase 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. Así, la invención se ocupa de una pluralidad de anticuerpos terapéuticos (que pueden ser del isotipo IgG, por ejemplo IgG1) tal como se describe en el presente documento que comprende un número definido (por ejemplo 7 o menos, por ejemplo 5 o menos tal como dos o una única) glucoforma(s) de dichos anticuerpos.

Los derivados de acuerdo con la invención también incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención acoplados a un polímero no proteínico tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileo. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para aumentar la semivida de proteínas, así como de reducir la capacidad antigénica e inmunógena de las proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineales o ramificados) se ha investigado 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 antígenos de la invención sin las funciones efectoras de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; (tal como un fragmento Fab o un scFv) acoplado 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. *ib*) o plantas (véase Doran PM, (2000) Curr. Opinion 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). Los anticuerpos también pueden producirse mediante síntesis química. Sin embargo, los anticuerpos de la invención habitualmente se producen usando tecnología de cultivo celular recombinante notoria para los expertos en la técnica. Se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para su posterior propagación o expresión en una célula huésped. Un sistema de expresión útil es un sistema de glutamato sintetasa (tal como el que comercializa Lonza Biologics), en particular en el que la célula huésped es CHO o NS0 (véase más adelante). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo sondas de oligonucleótidos). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minicromosomas de los que los plásmidos son una realización típica. Generalmente dichos vectores incluyen además una secuencia de señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, a promotor y secuencias de terminación de la transcripción ligadas operablemente al polinucleótido de la cadena ligera y/o pesada de forma que se facilite la expresión. Los polinucleótidos que codifican las cadenas ligera y pesada pueden insertarse en vectores separados e introducirse (por ejemplo mediante transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula huésped de forma concurrente o secuencial o, si se desea, tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector antes de dicha introducción.

Será inmediatamente patente para los expertos en la técnica que debido a la redundancia del código genético, también hay disponibles polinucleótidos alternativos a los que se describen en el presente documento que codificarán los polipéptidos de la invención.

2.1 Secuencias de señal

Las proteínas de unión a antígenos, por ejemplo los anticuerpos, de la presente invención pueden producirse en forma de una proteína de fusión con una secuencia de señal heteróloga que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura. La secuencia de señal debería ser reconocida y procesada por la célula huésped. Para las células huésped procarióticas, la secuencia de señal puede ser una secuencia líder de alcalina fosfatasa, penicilinas, o enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levaduras, las secuencias de señal pueden ser una secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder de factor α o secuencias líder de fosfatasa véase por ejemplo el documento WO90/13646. En los sistemas celulares de mamífero, hay disponibles secuencias líder víricas tales como la señal gD de *Herpes simplex* y las secuencias de señal de inmunoglobulina nativa (tal como cadena pesada de Ig humana). Habitualmente la secuencia de señal está ligada en marco de

lectura a un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención.

2.2 Origen de replicación

Los orígenes de replicación son notorios en la técnica, siendo pBR322 adecuado para la mayoría de las bacterias gram negativas, el plásmido 2 μ para la mayoría de las levaduras y diversos orígenes víricos tales como SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación de SV40 no es necesario para los vectores de expresión de mamífero integrados. Sin embargo, el SV40 ori puede estar incluido 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 proporcionan nutrientes no disponibles en el medio complejo o (c) combinaciones de ambos. El esquema de selección puede suponer detener el crecimiento de las células huésped que no contienen vector o vectores. Las células, que se han transformado con éxito con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención, sobreviven debido por ejemplo a la resistencia a fármacos que confiere el marcador de selección administrado al mismo tiempo. Un ejemplo es el sistema de selección DHFR en el que los transformantes se generan en cepas huésped negativas para DHFR (por ejemplo véase Page y Sydenham 1991 *Biotechnology* 9: 64-68). En este sistema, el gen DHFR es administrado al mismo tiempo que la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, secuencias polinucleotídicas de la invención y después se seleccionan las células positivas para DHFR mediante privación de nucleósidos. Si fuera necesario, también se emplea el inhibidor de DHFR metotrexato para seleccionar los transformantes con amplificación de genes de DHFR. Al ligar operablemente el gen de DHFR a la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, secuencias codificantes de la invención o derivados funcionales de los mismos, la amplificación del gen de DHFR produce la concomitante amplificación de la proteína de unión a antígenos deseada, por ejemplo anticuerpo, secuencias de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para esta selección de DHFR/metotrexato y los procedimientos para amplificar y seleccionar las células huésped usando el sistema DHFR están bien establecidos en la técnica véase Kaufman R.J. y col. *J. Mol. Biol.* (1982) 159, 601-621, para una 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. Un ejemplo adicional es el sistema de expresión de glutamato sintetasa (Bebbington y col., *Biotechnology* 1992 Vol 10 página 169). Un gen adecuado para la selección para usar en levaduras es el gen *trp1*; véase Stinchcomb y col. *Nature* 282, 38, 1979.

2.4 Promotores

Los promotores adecuados para la expresión de proteínas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos, de la invención están ligados operablemente a ADN/polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígenos por ejemplo un anticuerpo. Los promotores para los huéspedes procariotas incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, alcalina fosfatasa, triptófano y promotores híbridos tales como Tac. Los promotores adecuados para la expresión en células de levaduras incluyen 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 levaduras inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o de la utilización de maltosa/galactosa.

Los promotores para la expresión en los sistemas celulares de mamífero incluyen promotores de ARN polimerasa II que incluyen promotores víricos tales como polioma, difteria aviar y adenovirus (por ejemplo adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviario, citomegalovirus (en particular el promotor génico temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus de sarcoma de rous (RSV) y el virus simio temprano o tardío 40 y promotores no víricos tales como EF-1 α (Mizushima y Nagata *Nucleic Acids Res* 1990 18(17): 5322. La elección del promotor puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped que se usa 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 que se describen anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamífero adecuadas elemento potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotionina e insulina. De forma alternativa, puede usarse 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 el locus de IgG2a murino (véase el documento WO04/009823). Aunque dichos potenciadores habitualmente están localizados en el vector en un sitio aguas arriba del promotor, también pueden estar localizados en cualquier otro sitio por ejemplo en la región no traducida o aguas abajo de la señal de poliadenilación. La elección y posición del promotor puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped que se usa para la expresión.

2.6 Poliadenilación/Terminación

En los sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación están ligadas operablemente a un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, de esta invención. Dichas señales habitualmente están situadas 3' del marco de lectura abierto. En los sistemas de mamífero, las señales ejemplares no limitantes incluyen las que se derivan de hormonas de crecimiento, factor de elongación-1 alfa y genes víricos (por ejemplo SV40) o repeticiones de terminación largas retrovíticas. En los sistemas en levaduras los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las que se derivan de los genes de fosfoglicerato cinasa (PGK) y alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En los sistemas procariotas, las señales de poliadenilación habitualmente no son necesarias y en vez de eso es habitual emplear secuencias de terminación más cortas y más definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped que se usa para la expresión.

2.7 Otros procedimientos/elementos para mejorar los rendimientos

Además de lo anterior, otros elementos que pueden usarse para mejorar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, intrones y modificación de codones específica de la célula huésped. El uso de los codones de las proteínas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos, de esta invención puede modificarse de forma que se acomode a la tendencia de codones de la célula huésped de forma que se aumente la transcripción y/o el rendimiento del producto (por ejemplo Hoekema A y col. Mol Cell Biol 1987 7(8): 2914-24). La elección de los codones puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped que se usa para la expresión.

2.8 Células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar los vectores que codifican proteínas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos, de la invención son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias por ejemplo enterobacteriaceae 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 las levaduras, también se contemplan huéspedes tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo ATCC 16,045; 12,424; 24,178; 56,500), *Yarrowia* (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183, 070, véase también Peng y col. J. Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP244, 234), *Penicillium*, *Tolipocladium* y *Aspergillus*, *A. nidulans* y *A. niger*.

Aunque la invención contempla específicamente células huésped procariotas y de levaduras, habitualmente sin embargo, las células huésped de la presente invención son células de vertebrado. Las células de vertebrado adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (Nº de ATCC. CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), línea renal embrionaria humana 293, PerC6 (Crucell), células renales de hámster neonato (BHK) (ATCC CRL 1632), BHK570 (Nº de ATCC: CRL 10314), 293 (Nº de ATCC CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo CHO-K1, Nº de ATCC: CCL 61, línea celular de CHO sin DHFR tal como DG44 (Urlaub y col., Somat Cell Mol Genet (1986) Vol 12 páginas 555-566), en particular las líneas de células CHO adaptadas para el cultivo en suspensión, células sertoli de ratón, células renales de mono, células renales de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células renales caninas (ATCC CCL 34), células pulmonares humanas (ATCC CCL 75), Hep G2 y células de linfoma o mieloma por ejemplo NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

Así, en una realización de la invención se proporciona una célula huésped transformada de forma estable que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico tal como se describe en el presente documento. Habitualmente dichas células huésped comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Dichas células huésped también pueden diseñarse o adaptarse además para modificar la calidad, función y/o rendimiento de la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, de esta invención. Los ejemplos no limitantes incluyen expresión de enzimasificadoras específicas (por ejemplo de glucosilación) y chaperonas de plegamiento de las proteínas.

2.9 Procedimientos de cultivo celular.

Las células huésped transformadas con vectores que codifican las proteínas terapéuticas de unión a antígenos, por ejemplo los anticuerpos, de la invención pueden cultivarse mediante cualquier procedimiento conocidos por los expertos en la técnica. Las células huésped pueden cultivarse en matraces giratorios, matraces con agitación, frascos giratorios, reactores por ondas (por ejemplo System 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibras huecas pero para la producción a gran escala se prefieren reactores con tanque agitado o reactores en bolsas (por ejemplo Wave Biotech, Somerset, Nueva Jersey, EE.UU.), en particular para los cultivos en suspensión. Habitualmente los tanques agitados están adaptados para contar con aireación usando por ejemplo tubos burbujeadores, deflectores o impulsores de baja cizalla. Para las columnas con burbujas y los reactores neumáticos puede usarse aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células huésped se cultivan en un medio de cultivo sin suero,

aquel puede suplementarse con un agente protector para las células tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir los daños a las células como resultado del procedimiento de aireación. Dependiendo de las características de la célula huésped, pueden usarse o bien microtransportadores como sustratos de crecimiento para las líneas celulares dependientes de anclaje o las células pueden estar adaptadas a un cultivo en suspensión (que es lo habitual). El cultivo de células huésped, en particular de células huésped de vertebrado puede utilizar una variedad de modos de operación tales como en lotes, en lotes con alimentación, en lotes repetidos (véase Drapeau y col. (1994) Cytotechnology 15: 103-109), procedimiento en lotes extendido o cultivo con perfusión. Aunque las células huésped de mamífero transformadas por medios recombinantes pueden cultivarse en medio que contenga suero como suero de ternero fetal (FCS), se prefiere que dichas células huésped se cultiven en medio sin suero tal y como se describe en Keen y col. (1995) Cytotechnology 17: 153-163, o medio disponible comercialmente tal como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, EEUU), suplementado cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo sin suero de células huésped puede requerir que esas células estén adaptadas al crecimiento en condiciones libres de suero. Una estrategia de adaptación es un cultivo de dichas células huésped en medio que contiene suero y repetidamente cambiar un 80 % del medio de cultivo por el medio sin suero de forma que las células huésped aprendan a adaptarse a 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. editores), páginas 619-623, Kluwer Academic publishers).

Las proteínas de unión de antígenos, por ejemplo los anticuerpos, de la invención segregadas al medio pueden recuperarse y purificarse del medio usando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso que se pretenda. Por ejemplo el uso de proteínas de unión a antígenos terapéuticas, por ejemplo los anticuerpos, de la invención para el tratamiento de pacientes humanos habitualmente requiere una pureza de al menos el 95 % según se determina mediante SDS-PAGE reductora, más habitualmente 98 % o 99 % de pureza, comparada con el medio de cultivo que comprende las proteínas terapéuticas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos. Al principio habitualmente se eliminan los desechos celulares del medio de cultivo usando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante usando por ejemplo microfiltración, ultrafiltración y/o filtración profunda. De forma alternativa, la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, puede recolectarse mediante microfiltración, ultrafiltración o filtración profunda sin centrifugación previa. Hay disponible una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxipatita (HA), cromatografía por afinidad (que opcionalmente conlleva un sistema de marcado por afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el documento US 5.429.746). En una realización, las proteínas de unión a antígenos, por ejemplo los anticuerpos, de la invención, después de diversas etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía por afinidad con Proteína A o G seguida de etapas de cromatografía adicionales tales como intercambio iónico y/o cromatografía de HA, intercambio de aniones o cationes, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación con sulfato de amonio. Habitualmente, también se emplean diversas etapas de eliminación de virus (por ejemplo nanofiltración usando por ejemplo un filtro DV-20). Tras estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (habitualmente 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 supone una realización de la invención. Una concentración de 100 mg/ml o superior puede generarse mediante ultracentrifugación. De forma adecuada, dichas preparaciones están sustancialmente libres de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

Los sistemas bacterianos están adecuados en particular para la expresión de fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos están localizados en el interior de las células o en el periplasma. Las proteínas periplasmáticas insolubles pueden extraerse y replegarse formando proteínas de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, véase Sanchez y col. (1999) J. Biotechnol. 72, 13-20 y Cupit PM y col. (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

3. Composiciones farmacéuticas

Las preparaciones de proteínas de unión a antígenos purificadas, por ejemplo anticuerpos, de la invención (en particular preparaciones monoclonales) tal como se describe anteriormente, pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas para usar en el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos tales como los que se describen anteriormente. Habitualmente dichas composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir inerte) tal y como es conocido y requiere la práctica farmacéutica aceptable, véase por ejemplo Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, (1980), Mack Publishing Co. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen vehículo esterilizado tal como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponadas con tampones adecuados tales como acetato sódico trihidratado a un pH farmacéuticamente aceptable, tal como a un pH en un intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas inyectables (por ejemplo por vía intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraportal o por administración local al ojo mediante aplicación tópica o periocular al ojo o inyección intravítrea en el ojo) o para infusión continua están sustancialmente exentas de materia particulada visible y pueden comprender de 1 mg a 10 g de proteína terapéutica de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, habitualmente de 5 mg a 1 g, más específicamente de 5 mg a 25 mg o 50 mg de proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo. Los procedimientos para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas son notorios para los expertos en la técnica. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden de 1 mg a 10 g de proteínas terapéuticas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos, de la invención en forma

monodosis, opcionalmente junto con instrucciones de uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden liofilizarse para su reconstitución antes de la administración de acuerdo con procedimientos notorios u patentes para los expertos en la técnica. Cuando las realizaciones de la invención comprenden anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, puede añadirse un quelante de iones metálicos que incluyen cobre, tal como citrato (por ejemplo citrato sódico) o EDTA o histidina, a la composición farmacéutica para reducir el grado de degradación mediada por los metales de los anticuerpos de este isotipo, véase el documento EP0612251. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender un solubilizante tal como una base arginina, un detergente/agente contra la agregación tal como polisorbato 80, y un gas inerte tal como nitrógeno para sustituir el oxígeno del espacio superior del vial.

Las dosis eficaces y las posologías para administrar la proteína de unión a antígenos, por ejemplo el anticuerpo, de la invención generalmente se determinan de forma empírica y dependen de factores tales como la edad, peso y estado de salud del paciente y la enfermedad o trastorno a tratar. Dichos factores están dentro del alcance del médico a cargo. Las directrices para seleccionar las dosis apropiadas pueden encontrarse por ejemplo en Smith y col. (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, Nueva York pero en general serán de 1 mg a 10 g. En una realización, la pauta para tratar a un paciente humano es de 1 mg a 1 g de anticuerpo terapéutico de la invención administrados por vía subcutánea una vez a la semana o cada dos semanas, o mediante infusión intravenosa cada 1 o 2 meses. Dicha dosis corresponde a 0,014-140 mg/kg, tal como 0,014-14 mg/kg. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse de forma profiláctica.

Las composiciones también pueden administrarse de forma más local al ojo o mediante aplicación tópica, o por inyección intravítrea o por administración periocular, es decir bajo la esclerótica mediante inyección retrobulbar, peribulbar, subtenon o subconjuntiva. La administración sistémica puede ser suficiente para lograr una reducción drusen mediante una administración pasiva, por ejemplo intravenosa del anticuerpo terapéutico. Otras vías de administración local pueden permitir al anticuerpo terapéutico alcanzar el segmento posterior del ojo más fácilmente a dosis menores. Se ha descrito la aplicación tópica para permitir la penetración de fragmentos de anticuerpos la parte posterior del ojo en el modelo de conejo, (Williams KA, Bereton HM, Farrall A, Standfield SD, Taylor SD, Kirk LA, Coster DJ (2005) *Eye* 19; 910-913). Se ha descrito la inyección intravítrea de los fragmentos de anticuerpos o de anticuerpos monoclonales completos y los pacientes de AMD la toleran bien para los productos ranibizumab y bevacizumab. El anticuerpo terapéutico también puede administrarse mediante un implante intravítreo. Las inyecciones retrobulbares y peribulbares pueden lograrse con agujas especiales de calibre 23 a 26 y son menos invasivas que las inyecciones intravítreas. La inyección subtenon coloca la composición en contacto con la esclerótica durante un periodo más prolongado que podría ayudar a la penetración a la parter posterior del ojo. La inyección de proteínas justo debajo de la conjuntiva se ha descrito en modelos de conejo y esto permite que las moléculas se difundan de una forma más directa a través de la esclerótica para alcanzar el segmento posterior del ojo. Los sistemas de administración de fármacos de liberación mantenida pueden usarse también de forma que permitan liberar el material durante un intervalo de tiempo mayor al interior o alrededor del ojo de forma que la administración pudiera ser menos frecuente. Dichos sistemas incluyen micelas, geles, hidrogeles, nanopartículas, microcápsulas o implantes que pueden estar rellenos o recubiertos con composiciones terapéuticas. Estos pueden administrarse al cristalino ocular mediante inyección o por cualquiera de las otras vías menos invasivas descritas anteriormente, es decir por la vía periocular o subesclerótica. Los ejemplos de dichos sistemas de liberación mantenida y vías de administración local incluyen hidrogeles de liberación lenta termosensibles para la administración subesclerótica o intravítrea de una formulación con base de nanopartículas dirigida a la retina posterior y a la capa RPE (Janoira KG, Gunda S, Boddu SHS, Mitra AK, (2007) *Expert Opin Drug Deliv* 4: 371-388; Birch DG, Liang FQ, (2007) *Int J Nanomed* 2:65-77). Son posibles muchas otras combinaciones de sistema de administración y vía de administración local y podrían considerarse para las composiciones de anticuerpo terapéutico. Un anticuerpo también puede administrarse mediante un dispositivo físico tal como mediante iontoforesis (Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2008, Annual meeting, 27 de abril – 1 de mayo, Ponencias n.º 98/A125 y n.º 1813/D693 de EyeGate Pharma: Blalock y col., y Ruiz-Perez y col.).

4. Usos clínicos.

Se apreciará que las enfermedades que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados incluyen enfermedad de Alzheimer, deficiencia cognitiva leve, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con β -amiloidosis de tipo Holandés, angiopatía β -amiloide cerebral y diversos tipos de demencias degenerativas, tales como las asociadas a la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, degeneración basal cortical y enfermedad de Alzheimer de tipo con cuerpos de Lewis difusos, degeneración macular senil (AMD), enfermedades de "tipo Glaucoma" y formación de cataratas dependiente de β -A β .

En una realización de la invención, la enfermedad que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados es la enfermedad de Alzheimer.

En una realización adicional de la invención, la enfermedad que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados es degeneración macular senil (AMD), enfermedades de "tipo Glaucoma" y formación de cataratas dependiente de β -A β .

Aunque la presente invención se ha descrito principalmente con relación al tratamiento de enfermedades o trastornos humanos, la presente invención también puede aplicarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos

similares en mamíferos no humanos.

Ejemplos

Procedimientos

5	ABi8200	Sistema de detección celular macro confocal por fluorescencia para FMAT de Applied Biosystems 8200
	Biacore™/Biacore	Un dispositivo que permite la medición de la cinética en tiempo real de las interacciones moleculares usando SPR
	CM5	Chip sensor de Biacore™ con una superficie para usos variados recubierta con una matriz de dextrano carboximetilado
10	cSLO	Oftalmoscópico láser de barrido confocal
	ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
	FMAT	Tecnología de ensayo fluorométrico en microvolumen (Applied Biosystems)
	FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
	IHC	Inmunohistoquímica
15	Integra CL1000	Mini-biorreactores comercializados por IBS Integra Biosciences
	MSD®	Meso Scale Discovery
	ProSepA HiTrap	Columnas de Proteína A para FPLC que comercializa GE Healthcare
	RU	Unidad de resonancia (unidad arbitraria para cuantificar la unión a un chip sensor en mediciones en Biacore)
20	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
	SPR	(Resonancia de plasmón superficial): fenómeno físico que emplean los aparatos Biacore™ para la medición de los cambios en la masa del chip sensor
	SPSS	Paquete de software de análisis estadístico
25	SRU	SRU BIND™ Tecnología de biosensores que permite controlar las interacciones bioquímicas sin marcadores

Materiales

30	BSA	albúmina de suero bovina
	C57/BL6	"C57 black 6" - cepa endógama habitual de ratones de laboratorio
	DAB	3,3'-diaminobencidina
	DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
	DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
	DMSO	sulfóxido de dimetilo
	DTT	ditiotreitol
	EDTA	ácido etilendiaminatetracético
	FA	ácido fórmico
	FCS	suero de ternero fetal
35	FITC	isotiocianato de fluoresceína
	Glutamax	forma estable de glutamina que se añade al medio de cultivo (suplemento dipeptídico L-Ananil-L-Glutamina)
40	HEK	células renales embrionarias humanas 293

	Tampón de HBS-EP	Tampón Biacore™ para usos variados que contiene HEPES 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %
	HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
	Histoclear	agente clarificador tisular
5	HRP	peroxidasa de rábano
	IMS	licor metilado industrial
	Lipofectamina	agente de transfección basado en lípido catiónico que comercializa Invitrogen/Gibco
	NaCl	cloruro sódico
10	Opti-MEM	medio basado en el medio de Eagle modificado de Invitrogen/Gibco
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PFA	paraformaldehído
	PEG	polietilenglicol
	PPD	derivado de proteína purificado
15	PRF F12	medio sin rojo de fenol con Nutrient Mixture F-12
	RIBI	coadyuvante antigénico con base de emulsión de aceite en agua
	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
	TASTPM	cepa de ratones doblemente transgénica creada por el cruce de ratones Swedish con mutación APP695 (<u>TAS10</u>) con una cepa PS-1M146V (<u>TPM</u>)
20	TBS	solución salina tamponada con TRIS
	Transfast	agente de transfección liposómico que comercializa Promega
	Tris HCl	clorhidrato de tris-(hidroximetil)aminometano
	Tween-20	monolaurato de polioxietilensorbitán
	Versene	agente de quelación de iones metálicos (ácido etilendiaminatetraacético)
25	Abreviaturas	
	AMD	degeneración macular senil
	APP	proteína precursora amiloide
	BM	membrana de Bruch
	CFH	factor de complemento H
30	CFI	factor de complemento I
	CHO	células de ovario de hámster chino
	CNV	neovascularización de las coroides
	CPM	recuentos por minuto
	CSF	fluido cerebrospinal
35	ICV	intracerebroventricular
	IgG	inmunoglobulina gamma
	i.p.	intraperitoneal
	hAPP	proteína precursora amiloide humana

HIER	recuperación de antígenos inducida térmicamente
HVT	voluntario sano
KD	constante de disociación en el equilibrio
NDS	suero de burro normal
5 MO	meses de edad
MRT	tiempo de permanencia medio
OS	segmentos exteriores
RPE	células epiteliales de pigmento retiniano

10 Generación de anticuerpos monoclonales de ratón específicos para beta amiloide humano

Un conjunto de ratones se inmunizaron inicialmente con el péptido CGGGNKGAIIGLMVGG (que contiene los restos 27-38 de β -amiloide) (SEC ID N°: 7) acoplado en el extremo N a PPD. La respuesta inmunitaria de estos ratones se evaluó tomando una muestra de suero y analizándola en un ELISA con conjugados de ovoalbúmina del mismo péptido para determinar la valoración de anticuerpos para los ratones inmunizados. Sólo se observaron respuestas débiles. En otro experimento se inmunizó un conjunto de ratones con 10 μ g del péptido CGGGEDVGSNKGAIIGLMVGG (que contiene los restos 22-38 de β -amiloide) (SEC ID N°: 73) conjugado a PPD acoplado en el extremo N (derivado de proteína purificado; Cambridge Research Biochemicals) en adyuvante RIBI por vía intraperitoneal. La respuesta inmunitaria de estos ratones se evaluó de nuevo tomando una muestra de suero 7 días después de cada refuerzo y analizándola en un ELISA del mismo péptido para determinar la valoración de anticuerpos para los ratones inmunizados. Una vez los ratones hubieron alcanzado una respuesta óptima (basándose en un análisis comparativo de la valoración de los anticuerpo en las dos últimas muestras de suero) reforzando con 2,5 μ g de conjugado peptídico, se sacrificó al ratón con la mejor valoración de anticuerpos y se extrajo el bazo para la generación de hibridomas. Los hibridomas se generaron obteniendo las células de bazo y fusionándolas con células de mieloma usando metodología con PEG (polietilenglicol). La población de células mixtas resultante se plaqueó después en placas de cultivo celular de 96 pocillos.

Cada uno de los anticuerpos expresados contenido en el sobrenadante del cultivo se tamizó después en un inmunoensayo homogéneo de FMAT (Tecnología de ensayo en microvolumen por fluorescencia). Se identificaron 29 anticuerpos positivos en esta cascada de tamizado que dieron negativo para la proteína ovoalbúmina absorbida de forma pasiva sobre perlas de poliestireno pero dieron positivo para:

- (i) conjugado de ovoalbúmina acoplado en el extremo N a CGGGEDVGSNKGAIIGLMVGG (22-38) (SEC ID N°: 73) unido a perlas de poliestireno,
- (ii) péptido β -amiloide (1-40) biotinilado en el extremo N unido a perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina,
- (iii) péptido β -amiloide (1-40) biotinilado en el extremo C unido a perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina y
- (iv) péptido β -amiloide (24-34) biotinilado en el extremo N, donde los restos 24-34 de β -amiloide que son VGSNKGAIIGL (SEC ID N°: 8), están unidos a perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina.

Las muestras de sobrenadante con anticuerpos seleccionadas se analizaron para determinar la cinética de la unión al péptido β -amiloide (1-40) tal como se detalla más adelante.

40 Determinación de las velocidades de disociación de la interacción de unión (kd) usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial

Se usó un instrumento Biacore A100 para proporcionar la cinética de la velocidad de disociación para la interacción de los 29 anticuerpos seleccionados con β -amiloide (1-40). Para esto, se derivaron cubetas de flujo de un chip sensor Biacore con estreptavidina con niveles bajos β -amiloide (1-40) biotinilado en el extremo N. Se generaron tres curvas para cada muestra de anticuerpo y se introdujeron en ecuaciones de velocidad para obtener las velocidades de disociación. Para los 12 clones no fue posible establecer una clasificación en base a la velocidad de disociación porque no era posible medir la velocidad de disociación con las condiciones experimentales elegidas. Sin embargo, en estas condiciones, los 12 clones mostraron una velocidad de disociación (kd) de al menos 10^{-5} .

ELISA de unión de β -amiloide humano

- Los 29 anticuerpos contenidos en los sobrenadantes de los hibridomas identificados anteriormente se volvieron a analizar para determinar su unión a β -amiloide (1-40) humano mediante ELISA. Para lograr una comparación válida, se determinó la concentración del anticuerpo contenido en los sobrenadantes del cultivo usando un ELISA de cuantificación de IgG. Para determinar el isotipo del anticuerpo funcional a β -amiloide humano, se llevó a cabo un ELISA de unión usando un conjunto de anticuerpos de detección específicos de isotipo. Los 29 anticuerpos se unían a β -amiloide (1-40) humano en este formato de ELISA. Los isotipos para cada clon de anticuerpo unido podrían identificarse mediante el anticuerpo secundario específico de isotipo que se usaba contra IgG1, IgG2a o IgG2b. En un caso se observó una mezcla de isotipos funcionales.

Mapeo de epítomos mediante ELISA usando péptidos superpuestos

- Los epítomos reconocidos por los 29 anticuerpos que se seleccionaron a partir del tamizado primario y estaban contenidos en los sobrenadantes del hibridoma se mapearon mediante ELISA usando un conjunto de 31, péptidos 12-meros superpuestos que cubrían la secuencia completa del péptido β -amiloide 1-42. Todos los péptidos contenían un enlazador de 3 aminoácidos en el extremo C (glicina-serina-glicina) y un resto lisina biotinilado en el extremo.
- Se recubrieron placas de inmunoensayo de 96 pocillos toda la noche a 4 °C con 100 μ l de estreptavidina a 0,5 μ g/pocillo (Sigma) en agua destilada. Se lavaron las placas tres veces (PBS/0,01 % de Tween 20) y los pocillos se bloquearon con 250 μ l/pocillo de BSA al 3 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces y se añadieron 100 μ l de soluciones de péptidos (0,5 μ g/pocillo en 1 % de BSA 0,1 % de Tween 20 en PBS) a pocillos triplicados, durante 3 horas a temperatura ambiente. También se prepararon pocillos de control únicamente con DMSO. Las placas se lavaron tres veces y se añadieron 100 μ l de los 29 sobrenadantes de hibridoma (diluidos 1/20 en 1 % de BSA/ 0,1 % de Tween 20) a todos los pocillos y se incubó a 4 °C toda la noche. Las placas se lavaron tres veces y se añadió conjugado de anticuerpo contra IgG de ratón y peroxidasa de rábano (Amersham, diluido 1:2000 en 1 % de BSA, 0,1 % de Tween 20 en PBS) a 100 μ l/pocillo. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces, y la unión del anticuerpo de detección se reveló usando 100 μ l/pocillo de sustrato de tetrametilbencidina (Sigma) durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente controlando el desarrollo de color azul. La reacción se terminó y la densidad óptica se leyó para cada pocillo a 450 nm.

Todos los anticuerpos se unían a una región muy similar que contenía el motivo KGAIIGLM (equivalente a los restos 28-35 de β -amiloide) (SEC ID N°: 9).

Cinética de unión determinada mediante ensayo de resonancia de plasmón superficial

- Se evaluaron las afinidades de unión por β -amiloide y la cinética de 8 anticuerpos monoclonales que se seleccionaron a partir del conjunto de 29 en más detalle usando tecnología Biacore 3000. Las preparaciones de anticuerpos de ratón purificadas se capturaron sobre una superficie de chip con anticuerpo policlonal contra IgG de ratón. Se diluyó β -amiloide 1-40 humano preparado reciente con tampón de HBS-EP y se hizo pasar sobre la superficie con anticuerpo capturado a concentraciones que variaban en el intervalo de 4-500 nM durante 5 minutos. La disociación después de la inyección se observó durante otros 20 minutos más. La regeneración se logró mediante un toque de H_3PO_4 100 mM. Se demostró que los posteriores ciclos de captura de anticuerpo y unión a β -amiloide no se veían afectados por la regeneración. Todos los experimentos incluían una doble referencia con una superficie de blanco y con inyecciones de tampón de blanco. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 - Datos de afinidad y cinética por Biacore para ocho anticuerpos purificados seleccionados; los valores de KD que se muestran son de un experimento

mAb	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
2C1	6,63e4	1,29e-4	1,95
5C9	6,11e4	1,64e-4	2,69
4D4	7,32e4	8,27e-5	1,13
5D1	5,7e4	1,47e-4	2,57
6F6	1,06e5	6,57e-5	0,62
14B3	7,48e4	7,11e-5	0,95
2E11	8,45e4	1,7e-4	2,01
16D4	8,12e4	6,18e-4	7,62

Los resultados mostraron que las afinidades de los 8 anticuerpos monoclonales eran comparables aunque 16D4 mostró una afinidad al menos de 12 a 2,5 veces menor que los otros clones. Las diferencias en los valores de KD entre los 7 anticuerpos restantes en este experimento eran de hasta 4,4 veces. Dos de estos clones, 5D1 y 6F6, se seleccionaron para realizar estudio a mayor escala y se analizaron por triplicado. Estos datos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 - Datos de cinética y afinidad por Biacore para anticuerpos monoclonales purificados 6F6 y 5D1 (experimento por triplicado)

mAb	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
5D1	6,58e4	1,35e-4	2,05
(n=3)	±0,38e4	±0,10e-4	±0,15
6F6	9,93e4	9,4e-5	1,02
(n=3)	±0,93e4	±3,2e-5	±0,41

El mismo procedimiento por Biacore se usó también para investigar la unión de 6F6 a β -amiloide (1-40) y β -amiloide (1-42) humanos y murinos. El 6F6 se unió a todos estos péptidos con valores similares.

Unión a proteína precursora amiloide expresada en células (APP)

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

Ensayo con base de FMAT™ ABI8200

Se usó tecnología de ensayo en microvolumen fluorométrico (FMAT; sistema de detección celular 8200) para realizar un ensayo de unión con base celular a una proteína precursora amiloide expresada en células HEK 293T con los 8 anticuerpos seleccionados anteriormente. Las células HEK293T, o bien con transfección simulada o transfectadas con un plásmido que codifica APP humana de longitud completa se recolectaron 48 horas después de la transfección. Las células transfectadas se incubaron con diversas diluciones de los sobrenadantes de los hibridomas o con anticuerpos de control positivos LN27 (Zymed) IgG de ratón contra el dominio extracelular de APP y un anticuerpo de control negativo que sólo reconoce el extremo N libre del péptido β -amiloide (reactivo del laboratorio). La unión de los anticuerpos se reveló usando FMAT azul marcado contra anticuerpo de ratón y se detectó usando el sistema de detección celular 8200. Las señales de fondo obtenidas de las células con transfección simulada se restaron de las células transfectadas con APP. 7 clones no mostraron unión a APP expresada en células HEK293T comparadas con el anticuerpo monoclonal de control positivo LN27. Al estudiar los resultados con las células HEK293T con transfección simulada un clon (5C9) mostró indicios de unión no específica a las células HEK293T haciendo difícil la interpretación de la capacidad de unión a APP de este clon particular.

Unión a proteína precursora amiloide (APP) en cortes de cerebro de ratones transgénicos

Se investigaron cortes de cerebro de 2 ratones TASTPM de dos meses de edad (Howlett y col. 2008) o de ratones TAS10 de 12 meses de edad mediante IHC. Los cortes se trataron con ácido fórmico al 85 % y se tiñeron para detectar la unión a APP de longitud completa. A la edad elegida, los ratones respectivos no muestran depósitos de placas de amiloide aunque parte de la tinción puede deberse a que el amiloide intracelular sea accesible al usar esta técnica. El 6F6 no mostró tinción en estos cortes mientras que un anticuerpo de control para APP de longitud completa (Zymed) sí mostró tinción.

ELISA de unión a β -amiloide humano en forma de fragmento Fab

Se generó un fragmento Fab de 6F6 mediante escisión con proteasas estándar usando papaína inmovilizada sobre perlas (Pierce n.º 20341). Se realizó un ELISA para determinar su unión a péptido A β (1-40) humano inmovilizado en una placa de ELISA con fragmentos Fab de la IgG 6F6 purificados. El resultado de un único experimento ELISA mostró que un fragmento Fab de 6F6 todavía es capaz de unirse a un péptido A β (1-40).

Unión de 6F6 a amiloide humano nativo en muestras de plasma de voluntarios humanos

Se extrajo sangre completa de voluntarios sanos (HVT) en un tubo K2 EDTA mediante venopunción y el tubo se metió en hielo de forma inmediata. La muestra de sangre se procesó en 30 minutos centrifugando a 2000 x g durante 15 minutos a 4 °C para obtener el plasma. Después se añadió inhibidor de proteasas (Roche Complete Protease Inhibitor cocktail, n.º de cat.: 11 973 580 001, Roche Applied Science) al plasma de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las partes alícuotas de plasma se congelaron después a menos de -70 °C antes de analizar.

El ensayo usó 6F6 como anticuerpo de captura en un formato de inmunoensayo ECL en 96 pocillos (Meso Scale Discovery, MSD). De forma resumida, el 6F6 se recubrió en puntos sobre una placa de MSD de 96 pocillos; después se añadieron muestras (ensayo de calibrado, control negativo, QC y muestras de prueba). Tras la incubación, el material no unido se eliminó por lavado y el anticuerpo de detección (4G8 biotinilado, (específico para el epítipo de β -amiloide 17-24)) se aplicó después para incubar. Esto vino seguido de la adición de estreptavidina-sulfo-TAG después de lavar. Al final de esta incubación, se aplicó una etapa de lavado. La adición de tampón de lectura T de MSD a la placa permitió leer una señal electroquimioluminiscente en el MSD Sector Imager 6000. La concentración de analito se calculó a partir de la señal de MSD usando una curva estándar de ensayo establecida con concentraciones conocidas de A β 1-42. El límite inferior de cuantificación para el ensayo era de 78,1 pg/ml.

La Tabla 4 resume las concentraciones de A β de 10 muestras de plasma de voluntarios sanos medidas mediante el ensayo con anticuerpos 6F6-4G8 descrito anteriormente. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Tabla 4. Concentración de A β en muestras de voluntarios sanos medida mediante anticuerpos contra 6F6-4G8

Muestra	Rep1	Rep2	Media
HVT1	695,780	653,251	674,517
HVT2	602,650	596,211	599,431
HVT3	685,350	684,026	684,688
HVT4	660,760	653,754	657,259
HVT5	629,980	582,975	606,478
HVT6	524,470	517,987	521,230
HVT7	681,420	678,934	680,175
HVT8	618,910	579,181	599,045
HVT9	616,190	605,367	610,779
HVT10	1029,050	947,771	988,413
Media			662,202
DT			125,153

Unión a A β 1-42 en condiciones naturales y desnaturizantes mediante transferencia western

Se investigó el anticuerpo monoclonal 6F6 purificado para determinar su unión a diversas formas de A β 1-42 y se analizó en SDS-PAGE natural o desnaturizante. A β 1-42 se usó o bien de preparación reciente o pretratado toda la noche con PRF F12 a 4 °C, toda la noche en PBS a 37 °C o toda la noche en HCl 10 mM a 37 °C. Las preparaciones se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia Western usando el anticuerpo 6F6 o 6E10 (anticuerpo específico para A β 1-16 humano; reactivo comercial, Eurogentec) y 5G5 (anticuerpo específico para A β 1-42; reactivo propio). Los resultados mostraron que en los geles naturales 6E10 reconoce formas superiores de amiloide mientras que 6F6 y 5G5 únicamente mostraron una señal relativamente débil contra estas formas oligoméricas y fibrilares. En condiciones desnaturizantes, 6F6 y 5G5 de forma predominante reconocieron formas monoméricas de beta amiloide mientras que 6E10 específico del extremo N fue todavía capaz de unirse a agregados superiores de beta amiloide que no se resolvieron mediante las condiciones de desnaturización que se usaron en este experimente Fig. 1). En conclusión esto indica que en estas condiciones y usando las preparaciones de amiloide que se describen anteriormente 6F6 se une con preferencia a las formas de menor peso molecular y a los monómeros de A β 1-42.

Mapeo de epítipos mediante ELISA de anticuerpo monoclonal 6F6 purificado

Se usó anticuerpo monoclonal 6F6 purificado para repetir el mapeo de epítipos descrito anteriormente mediante ELISA. El protocolo que se utilizó era el mismo salvo que se añadieron 100 μ l de solución de anticuerpo purificado diluido (0,1 μ g/ml en 1 % de BSA) en lugar de sobrenadante de cultivo de hibridomas.

El anticuerpo monoclonal 6F6 purificado se unió al motivo KGAIIGL (equivalente a los restos 28-34 de β -amiloide) pero la unión se potenciaba mucho si se incluía el resto 35M en el péptido (equivalente a los restos 28-35 de β -amiloide; (SEC ID N°: 9)). No pueden excluirse contribuciones menores de los restos próximos usando técnicas de mapeo de epítomos superpuestos.

5 Mapeo de epítomos mediante resonancia de plasmón superficial del anticuerpo monoclonal 6F6

El anticuerpo monoclonal 6F6 purificado se inyectó durante 3 minutos a 8-64 nM sobre péptidos biotinilados en el extremo C que representaban 24-35 (SEC ID N°: 10: VGSNKGAIIGLMGSG), 28-39 (SEC ID N°: 11: KGAIIGLMVGGVGGSG) y 31-42 (SEC ID N°: 12: IIGLMVGGVVIAGSG) de la secuencia de β -amiloide capturada mediante un chip sensor recubierto con estreptavidina. El experimento se realizó usando un aparato Biacore 3000.

10 Los resultados mostraron que 6F6 era capaz de unirse al péptido 24-35 y 28-39 pero no al péptido 31-42 de β -amiloide, lo que confirma los resultados con péptidos superpuestos anteriores. También puede indicar que los restos 31-35 no son suficientes para su unión a 6F6 y los restos más allá de la posición 35 parecen no estar implicados en la unión de este anticuerpo.

15 Efecto de la administración intravenosa de los anticuerpos monoclonales 6F6 y 5D1 contra β -amiloide sobre los niveles de amiloide en sangre tras la administración central de amiloide

El objetivo de este estudio era investigar los niveles de radioactividad en sangre tras la inyección intracerebroventricular (ICV) de ^{125}I ($1\mu\text{Ci}$) de β -amiloide 1-40, en ratones a los que previamente se les había inyectado el anticuerpo de prueba.

20 Se administró ^{125}I ($1\mu\text{Ci}$) de β -amiloide 1-40 a ratones C57BL6/J macho canulados ICV ($n=8-10$ por tratamiento) mediante infusión ICV. Una hora antes de la infusión ICV de ^{125}I de β -amiloide 1-40, se les inyectó a los ratones o bien solución salina tamponada con fosfato (PBS) o $600\mu\text{g}$ de anticuerpo monoclonal contra β -amiloide 6F6 o 5D1 por vía intravenosa. Los animales se devolvieron a sus jaulas después de la infusión ICV y a las 4 horas de la infusión ICV se sacrificaron y se tomaron muestras de la sangre y se detectaron los recuentos por minuto (CPM) de radiación gamma.

25 Preparación quirúrgica.

Se anestesió a los ratones mediante inhalación de isoflurano (3-5 %) y se posicionaron en un marco estereotáxico. Antes de los procedimientos quirúrgicos, los ratones recibieron $0,05\text{ ml}$ (dilución 1:10 de solución madre) de vetergesic® subcutáneo (Buprenorfina) como analgésico. Se practicó una incisión en la línea media del cuero cabelludo y el aspecto dorsal del cráneo se limpió y se secó. Se introdujo una cánula en el ventrículo lateral

30 mediante un agujero taladrado en el cráneo a las siguientes coordenadas estereotáxicas relativas al temporal (anterioposterior (AP): $-0,5$ lateral (L): $+0,7$ dorsal/ventral (DV): $-2,5$). Se taladraron otros dos agujeros a través del cráneo en los que se introdujeron tornillos corticales. La cánula se ancló para que no se moviera mediante un gel de cianoacrilato y la incisión se suturó alrededor del tapón superior de gel de cianoacrilato. Tras la operación los ratones recibieron $0,3\text{ ml}$ de solución salina por vía subcutánea y se dejaron en un entorno caliente para que se recuperaran de la anestesia. Cuando se incorporaron de nuevo, los ratones se alojaron de uno en uno y se sometieron a 5 días de cuidados postoperatorios estándar. No se realizó ningún otro procedimiento durante 5 días o hasta que volvieron al peso anterior a la operación.

Colocación de la cánula

Después de la recuperación, se verificó la colocación de la cánula mediante la respuesta a la angiotensina II de ingestión de agua. Cada ratón recibió la administración ICV de 100 ng de angiotensina II. Después de la administración, se observó la ingestión de agua durante 15 minutos.

40

Resultados

Se observó un aumento significativo de la radioactividad en la sangre de los animales a los que se les administró ambos anticuerpos monoclonales 6F6 y 5D1 comparados con los animales a los que se les administró vehículo presumiblemente debido a la capacidad de unirse a β -amiloide radiomarcado en circulación y extendiendo así la semivida en sangre del péptido β -amiloide 1-40 marcado. Las diferencias entre los anticuerpos monoclonales no fueron significativas. El tratamiento con 6F6 y 5D1 provocó un aumento estadísticamente significativo de CPM comparado con el control de vehículo inyectado – (CPM: vehículo 1280 ± 312 ; 5D1 8152 ± 2001 ; 6F6 8875 ± 2123) Univariate ANOVA, $F(3,32) = 15,14$ $p < 0,001$ (los datos se han convertido a logarítmicos), prueba LSD post-hoc *** $p < 0,001$ todos los grupos comparados con el vehículo.

45

50

Investigación de la farmacocinética de la formación del complejo de 6F6 y amiloide en cobayas

El objetivo de este estudio era determinar la formación de complejos de anticuerpo y β -amiloide *in vivo* en cobayas que tienen una secuencia de aminoácidos de β -amiloide idéntica a la de los seres humanos. Esto se logró midiendo la concentración de anticuerpos libres y los complejos de anticuerpo y β -amiloide en diversos tiempos durante un periodo de 19 días.

55

Procedimiento

Se preparó quirúrgicamente a cobayas Dunkin-Hartley macho, anestesiados con isoflurano con una cánula doble en la vena yugular. Las cobayas canuladas recibieron una infusión intravenosa de anticuerpo 6F6 (n = 6) durante 1 hora. Se administraron preparaciones de anticuerpo purificado en solución de PBS a 0,700 y 0,625 ml/kg/h, respectivamente para lograr una dosis diana de 3 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre (60 µl) de cada cobaya antes de la administración (0 min.) y se introdujeron en tubos de EDTA en los siguientes tiempos (durante 20 días) después de iniciar la infusión: 15, 30, 45, 60 (iv sin infusión), 90, 120, 180, 360 min, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 312, 360, 408 y 456 h.

Se tomaron muestras grandes (0,5 ml) a las 0, 10, 96, 216, 312 y 456 h después del inicio de la infusión. Después de la última muestra de sangre el día 20, se anestesió a los animales y se extrajo la sangre. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta su análisis por ELISA. Se evaluaron los niveles de anticuerpos libres mediante ELISA de unión de antígenos usando placas de microtitulación recubiertas con β-amiloide 1-40. Se añadieron muestras de plasma de 0, 10 h, 96 h, 196 h, 312 h y 456 h a estos pocillos y el anticuerpo monoclonal 6F6 unido se detectó usando conjugado de IgG-HRP contra ratón. Los complejos de β-amiloide y anticuerpo se detectaron mediante captura en placas recubiertas con anticuerpo policlonal específico del extremo C de β-amiloide 42. Los complejos capturados se detectaron mediante el anticuerpo monoclonal 6F6 con conjugado de biotina contra IgG de ratón y kriptato de europio con estreptavidina.

Resultados

Los niveles de anticuerpos libres aumentaron rápidamente tal y como era de esperar después de la administración IV (intravenosa) pero también bajaron muy rápidamente durante el primer periodo de 24 horas. Los niveles alcanzaron un nivel estable aproximadamente a las 160h. Los resultados muestran una velocidad de aclaramiento en ratón de 1,75 ml/h/kg para el anticuerpo 6F6 y un tiempo de permanencia medio (MRT) de 49,4 h.

Los niveles de complejo también aumentaron rápidamente después de la administración de anticuerpo y los niveles de complejos medios permanecieron estables a ese nivel durante el resto del estudio. Sin embargo, los animales individuales mostraron una variación considerable. En algunos animales los niveles de complejo disminuyeron, en algunos animales los niveles de complejo aumentaron pero en la mayoría de los casos los niveles estuvieron estables desde aproximadamente el tiempo de 216 h en adelante. El experimento mostró que pueden formarse complejos con amiloide equivalente humano *in vivo* y que el nivel de complejos no cambia durante un periodo de tiempo prolongado en plasma tras la administración de una única dosis.

Estudio de administración de 6F6 durante 4 semanas en ratones transgénicos TASTPM

Los ratones transgénicos (tg) que hiperexpresan la proteína precursora amiloide humana (hAPP) proporcionan un modelo de amiloidosis y son adecuados para estudiar la influencia de los fármacos sobre la producción, captura y deposición de amiloide. Para este estudio se usaron ratones TASTPM transgénicos que hiperexpresaban la proteína precursora amiloide humana y una forma mutante de presenilina 1 (cepa de ratones doblemente transgénicos creados por el cruce de ratones Swedish con la mutación APP695 (TAS10) con una cepa PS-1M146V (TPM) (Howlett y col. 2008). El estudio se realizó en ratones machos y hembras de aproximadamente 10 semanas de edad.

Los animales estaban en tres grupos de tratamiento:

Grupos de tratamiento:

(A) Animales tg se sacrificaron el día 1 sin recibir compuesto para determinar los niveles de amiloide al inicio del estudio (n=16; 9 machos, 7 hembras)

(B) Animales tg que recibieron vehículo (PBS) mediante inyección intraperitoneal dos veces a la semana durante 4 semanas (n=19; 9 machos, 10 hembras)

(C) Animales tg que recibieron 6F6 300 g por ratón mediante inyección intraperitoneal dos veces a la semana durante 4 semanas (n=19; 9 machos, 10 hembras)

Los animales se dividieron en 3 grupos de tratamiento iniciando el tratamiento con una semana de diferencia.

Las muestras de sangre se tomaron antes de la 2ª, 4ª, 6ª y 8ª dosis en 3 animales macho y 3 hembra por grupo de tratamiento mediante extracción de la vena caudal. Se prepararon muestras de plasma en EDTA de todos los grupos el día 1 (Grupo A) o 4 semanas después de la primera dosis (grupos B y C). Se tomaron los hemisferios izquierdo y derecho, se congelaron de forma ultrarrápida y se almacenaron a -80 °C hasta el posterior análisis para determinar los niveles bioquímicos de amiloide. También se realizaron extracciones de la cola y se usaron para confirmar el genotipo.

Determinación de la carga de amiloide bioquímico en homogenados de cerebro

Se determinó el nivel de Aβ1-40 y Aβ1-42 en muestras de cerebro extraídas usando la tecnología ORIGEN (Igen

International Inc). De forma resumida, se pesaron y extrajeron los hemisferios cerebrales en guanidina HCl 5 M (Calbiochem) que contenía inhibidor de proteasa Complete TM (Roche Diagnostic) a 150 mg/ml p/v usando un mortero de mano. Los extractos se diluyeron en tampón lgen y en el ensayo se usaron diluciones a 1:10 y 1:40 clarificadas por centrifugación a 20000 g.

- 5 El ensayo ORIGEN empleaba Dynaperlas recubiertas con estreptavidina (Dyna) con anticuerpo 6E10 biotinilado inmovilizado (específico para A β 1-16 humano; Signet Labs) para capturar el A β de las muestras y detectar A β unido con G210 (anticuerpo específico para A β 1-40; reactivo del laboratorio) marcado con ori-tag o 5G5 (anticuerpo específico para A β 1-42; reactivo del laboratorio).

- 10 El análisis de la carga de A β 1-40 y A β 1-42 post-mortem de cada grupo mostró que no se producía una reducción de la carga de amiloide cerebral por el tratamiento con 6F6 en este estudio y mediante el procedimiento analítico que se empleó aquí. No fue posible alcanzar conclusiones definitivas sobre la potencial reducción del amiloide cerebral porque el patrón del aumento de A β en el cerebro de los animales tratados con vehículo durante el transcurso del estudio era pequeño y no uniforme entre todos los animales.

Determinación de niveles en plasma de anticuerpo 6F6

- 15 Se evaluaron muestras de plasma en EDTA longitudinales y terminales para determinar los niveles de anticuerpos mediante ELISA. De forma resumida, las muestras se diluyeron 1:50, 1:500 y 1:5000 y se añadieron a placas de ELISA con 0,5 μ g/ml de péptido A β 1-40 inmovilizado diluido en PBS. Las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C, se lavaron y el anticuerpo 6F6 unido se detectó usando conjugado de peroxidasa de rábano contra ratón. Las concentraciones de las muestras se determinaron usando una curva de patrones producida usando 8
- 20 concentraciones conocidas de 6F6 que variaban de 0 a 30 μ g/ml.

- Los resultados mostraron que a todos los ratones se les administró anticuerpo 6F6 con éxito y que las concentraciones terminales en plasma tenían un valor medio de aproximadamente 250 μ g/ml. Las muestras de plasma longitudinales mostraron un aumento de los niveles en plasma entre la 2ª y 4ª dosis debido a la administración repetida pero se mantuvieron a un nivel de al menos 150 μ g/ml hasta el final del estudio en todos los
- 25 animales muestreados.

Determinación de complejos de amiloide y anticuerpo en plasma mediante inmunoprecipitación y transferencia western

- Para examinar si los complejos de anticuerpo y A β se habían formado en este estudio *in vivo*, se investigaron las muestras de plasma para determinar la formación de complejos usando inmunoprecipitación y posterior análisis por
- 30 transferencia western. De forma resumida, se incubaron muestras de plasma de 15 μ l y se agitaron durante 3 h a 4 °C con 10 μ l de suspensión de perlas sobre proteína A sefarosa. Las perlas se lavaron 5 veces en 1 ml de PBS helado que contenía inhibidor de proteasas. Cada vez se centrifugaron las muestras durante 2 min a 2000 rpm a 4 °C. Después de lavar, las perlas se volvieron a suspender en 20 μ l de tampón de muestras para electroforesis que contenía DTT 0,1 M. Las muestras se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron como anteriormente. Después de
- 35 volver a hervir el sobrenadante, las muestras se cargaron en 10 % de minigeles de Bis/tris y se separaron mediante electroforesis. Los geles se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon y se sondaron con anticuerpo 6E10 (específico para A β 1-16 humano; Signet Labs). La detección de 6E10 unido se hizo con tinte de IR dye800 conjugado anticuerpo de cabra contra IgG de ratón (H+L) (Rockland). Las transferencias se visualizaron usando un sistema de obtención de imágenes por infrarrojos Odyssey.

- 40 Los resultados mostraron que el A β de bajo peso molecular podía detectarse en las transferencias que se purificaron al mismo tiempo usando el procedimiento de inmunoprecipitación. Podría concluirse que se formaron complejos de 6F6 con A β *in vivo* presentes en las muestras de plasma. La intensidad de las bandas era menor en los animales hembra analizados. En general, esto confirmó que 6F6 es capaz de unirse a A β humano *in vivo* y formar complejos estables que pueden detectarse mediante transferencia western.

45 Estudio de administración de 6F6 durante 16 semanas en ratones transgénicos para hAPP

- Se usaron ratones transgénicos que hiperexpresan hAPP(751) controlado por el promotor Thy-1 murino que expresan APP humano con las mutaciones London (717) y Swedish (670/671) en niveles elevados, que producen un aumento dependiente de la edad de amiloide beta 1-40 y amiloide beta 1-42 (A β 1-40 y A β 1-42). Estos ratones desarrollan placas constituidas por deposiciones de amiloide a una edad temprana, que se inicia aproximadamente a
- 50 los 4 meses. La gravedad de la patología cerebral muestra una relación directa con el aumento de la edad y las deficiencias del comportamiento. Este estudio se realizó ciego para el investigador sin revelar la identidad del compuesto que se estaba administrando. Se asignaron ratones transgénicos hembra con una edad de 4 meses en 3 grupos (n= 15 por grupo) así como un grupo de compañeros de camada no transgénicos y se trataron una vez a la semana por vía intraperitoneal durante un periodo de tiempo de 4 meses. El grupo de los compañeros de camada y
- 55 un grupo de tg que recibía la IgG de control hacían de controles. Al final del tratamiento se realizó un análisis del comportamiento (laberinto de agua de Morris, reconocimiento de objetos nuevos) y se sacrificó a los animales. Se extrajo el cerebro, CSF y el plasma sanguíneo. Se procesó un hemisferio de cada cerebro para su evaluación

histológica, el segundo se congeló inmediatamente para determinar A β 1-38, A β 1-40 y A β 1-42 en las fracciones de homogenado de cerebro así como de CSF con TBS, Triton X-100, SDS y ácido fórmico (FA). Se determinó la carga de placas en el cerebro usando inmunotinción con anticuerpo contra beta amiloide 6E10 y se determinaron el área de la superficie de las placas y el número de placas y se contaron con un programa de análisis de imágenes por ordenador (Image Pro Plus, version 4.5.1.29). Se investigó la densidad de las sinapsis usando tinción con anticuerpos específicos de sinaptofisina (Neomarkers®) marcados con un anticuerpo secundario biotinilado con sistema de detección VIP (Vector®).

Grupos de tratamiento: 3 grupos de animales tg (15/grupo) y un grupo de animales C57BL6 no transgénicos (n=15):

(A) Animales tg que recibieron el compuesto 6F6 a 17 mg/kg de peso corporal una vez a la semana (n=15)

(B) Animales tg que recibieron el compuesto mlgG2a 17 mg/kg de peso corporal (n=15)

(D) Animales tg que recibieron el compuesto 6F6 a 33 mg/kg de peso corporal (n=15)

(E) Compañeros de camada no transgénicos que recibieron mlgG2a 17 mg/kg de peso corporal (n=15)

Determinación de la carga de amiloide bioquímico en homogenados de cerebro extraídos secuencialmente y CSF

Se extrajo CSF de los animales de los grupos de tratamiento A, B y D e inmediatamente se congeló hasta que estuvo preparado el análisis posterior con al técnica ELISA. Para los homogenados de cerebro, se homogeneizaron los hemisferios congelados de los animales de los grupos A, B y D en 5 ml de solución salina tamponada con TRIS (TBS) que contenía cóctel inhibidor de proteasas. Aproximadamente la mitad de los homogenados de cerebro se congeló inmediatamente en partes alícuotas. La otra mitad se centrifugó a 74,500 g durante 1 hora y los sobrenadantes resultantes (= fracción de TBS), se repartió en partes alícuotas y se mantuvo a -20 °C hasta la determinación. Los sedimentos se suspendieron en Triton X-100 (2,5 ml), se centrifugaron y los sobrenadantes se repartieron en partes alícuotas y se mantuvieron a -20 °C. Estas etapas se repitieron con SDS (2,5 ml). Los sedimentos de la fracción de SDS se suspendieron en 70 % de ácido fórmico (0,5 ml) antes de la posterior centrifugación. Los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron con TRIS 1 M (9,5 ml) se repartieron en partes alícuotas y se mantuvieron a -20 °C. Se usó CSF así como las muestras de las cuatro fracciones de cerebro para la determinación de A β 38, A β 40 y A β 42 usando un kit disponible comercialmente (Mesoscale Discovery Abeta 3-plex kit n.º K15148E usando Sector Imager MS2400), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calcularon los valores cerebrales en términos de ng de A β por g de cerebro seco, los valores de CSF se calcularon en términos de pg de A β por ml.

En la fracción de TBS, los niveles de A β de los animales del grupo B eran los más bajos para las tres especies de amiloides. Para A β 42 este aumento de los grupos de tratamiento con 6F6 A y D fue significativo para el grupo de control B ($p < 0,05$ comparado con el grupo A y $p < 0,001$ comparado con el grupo D) pero no fue significativo para A β 38 y A β 40. En las fracciones con Triton X-100 los niveles medios de A β 42 también aumentaron significativamente en los grupos de tratamiento con 6F6 A ($p < 0,05$) y D ($p < 0,01$) comparados con el grupo de control B. Los niveles de A β 40 de los grupos B y D no difirieron de forma significativa, mientras que los del grupo A todavía estaban significativamente aumentados con respecto al grupo de control B ($p < 0,05$). Aunque no fue significativo, se observó un aumento de A β 38 en el grupo de tratamiento con 6F6 A comparado con el grupo de control B pero el grupo de tratamiento con 6F6 D disminuyó ligeramente comparado con el grupo de control B. El A β unido e insoluble en agua, medido en la fracción de SDS y FA era significativamente mayor en los cerebros de los animales del grupo de tratamiento con 6F6 A comparado con los grupos B (A β 38 y A β 42) o D (A β 38 y A β 40). El grupo de control B y el grupo de tratamiento con 6F6 D no difirieron significativamente.

En las muestras de 6F6 no se observaron diferencias significativas entre los grupos para los niveles de A β 38 y A β 40. Los niveles de A β 38, A β 40 y A β 42 eran ligeramente menores en los animales del grupo de control B comparados con el grupo de tratamiento con 6F6 A. Los niveles de A β 42 en CSF de los animales del grupo de tratamiento con 6F6 D estaban significativamente aumentados comparados con un grupo de control B ($p < 0,05$) lo que posiblemente indica la movilización de A β 42 soluble por secuestro al CSF o indirectamente por el flujo sanguíneo.

Determinación de la densidad de las sinapsis

Por cada animal se tiñen tres cortes con un anticuerpo contra sinaptofisina (1:200; Neo Markers; n.º de Cat. RM9111-SO) y anticuerpo secundario biotinilado (1:200; Vector Laboratories; n.º de Cat. PK-6101) seguido de revelado con VIP (kit sustrato para peroxidasa; n.º de Cat. SK4600). Para determinar la densidad de las sinapsis media individual, se evalúan tres imágenes por región (capa granular de las CA1, CA3 del hipocampo y hoja media de la circunvolución dentada (DGmb)) y los cortes se evaluaron en un procedimiento de medición basada en el macro. Durante el experimento de macro, las imágenes se contrastan del mismo modo y se cuentan las sinapsis por encima de un umbral constante. Las sinapsis únicas y sucesivas se cuentan por separado con las restricciones de uso del tamaño. El área total de las sinapsis en sucesión se divide entre el tamaño medio de las sinapsis únicas. El recuento de sinapsis total se calcula con la siguiente fórmula:

$$\Sigma \text{ Sinapsis} = n.^{\circ} \text{ de sinapsis distintas} + \frac{\text{Área de sinapsis en sucesión}}{\text{Área media de sinapsis separadas}}$$

- 5 Además, el área de la imagen se corrige teniendo en cuenta el ruido de fondo teniendo en cuenta una reducción del área de los vasos sanguíneos y la suma de la sinapsis se considera relativa al área de imagen total reducida por el área de los vasos sanguíneos.

La medición obtenida de los recuentos sinápticos en la región CA1, CA3 y GDmb de los cortes del hipocampo cerebral de los grupos de tratamiento A, B y D permaneció sin cambios entre los grupos de tratamiento.

10 Determinación de los niveles longitudinales en plasma de beta amiloide total y no unido (libre)

Se tomaron muestras de sangre *in vivo* antes de iniciar el tratamiento (día 0) y de nuevo las semanas 3, 6, 9 y 12 mediante toma de muestras mandibulares de la vena/arteria facial. Las muestras de sangre se introdujeron en EDTA y viales sin recubrimiento para obtener el plasma. Todas las muestras de plasma se congelaron y se almacenaron hasta su análisis.

- 15 Los niveles de amiloide no unido (libre) y los niveles de amiloide total (A β no unido y formando complejos con anticuerpo) se determinaron usando la estación de trabajo Gyrolab™. Se usó el mAb murino 6F6 biotinilado como reactivo de captura para el ensayo de β -amiloide libre y un anticuerpo específico contra β -amiloide biotinilado en el extremo N (reactivo del laboratorio) como reactivo de captura para el ensayo de β -amiloide total. Ambos reactivos de captura se capturaron en la columna de captura Gyros Bioaffy CD que contenía una matriz recubierta con estreptavidina. Se añadieron los anticuerpos de captura a una concentración de 700 nM. Para ambos ensayos se usó 4G8 marcado con Alexa 647 (específico para el epítipo 17-24 de β -amiloide) a una concentración de 12,5 nM para la detección. Para cuantificar la cantidad de β -amiloide de las muestras se preparó una curva con patrones de A β 1-42 (Innogenetics A β 1-42) proporcionando un rango dinámico de 31,25 pg/ml a 20000 pg/ml. La dilución la curva de patrones de A β 1-42 y las muestras de plasma se realizó en plasma humano sin β -amiloide. Los datos se analizaron usando el programa inherente al aparato y después se representaron en Excel.

- 20 Los niveles totales de β -amiloide aumentaron más de 2000 veces para la semana 3 (el primer tiempo) tanto en los grupos de tratamiento con 6F6 a 17 mg/kg y 33 mg/kg. El grupo de tratamiento a 33 mg/kg presentaba un nivel ligeramente mayor de nivel de β -amiloide total observado durante la duración del estudio pero no presentaba una correlación directa con el mayor nivel de dosis posible, lo que indicaba que el efecto estaba alcanzando la saturación. Se observó que los niveles de β -amiloide libre para los grupos de tratamiento con 6F6 era el nivel de ruido de fondo que mostraban los ratones no transgénicos en el primer tiempo después del tratamiento (3 semanas), presumiblemente debido a que la mayoría sino todo el β -amiloide detectado con este ensayo estaba formando complejos de anticuerpo y β -amiloide. Sin la intervención del tratamiento, los niveles iniciales de beta amiloide para los ratones transgénicos era aproximadamente 6 veces mayores que los de los ratones de control no transgénicos.

35 Determinación de la carga de las placas usando tinción con 6E10

- De las mitades de cerebro de los 18 ratones Tg (6 de del grupo de Tg A; B y D) se preparó un número suficiente de cortes por cerebro para cuantificar los depósitos amiloides. La inmunoreactividad de 6E10 se evaluó cuantitativamente en el hipocampo y el córtex. Se cortaron sagitalmente 15 secciones por capa (en total 5 capas que corresponden a las figuras 104 a 105, 107 a 108, 111 a 112, 115 a 116 y 118 a 119 de acuerdo con el atlas de morfología "The Mouse Brain" de Paxinos y Franklin, 2ª Edición), cada una de 5 μ m de grueso (Leica SM 2000R). Los tejidos de todos los animales transgénicos investigados se manejaron exactamente del mismo modo para evitar sesgos debidos a la variación de este procedimiento.

- 45 Las deposiciones de amiloide y la carga de placas se determinaron usando el anticuerpo monoclonal 6E10 (Signet®) dirigido contra la posición 1-17 del péptido β -amiloide humano. Las áreas de la región medida del hipocampo y del córtex eran constantes en todos los cerebros investigados, lo que excluye los efectos negativos sobre el tejido de las etapas de tinción inmunohistoquímica (por ejemplo encogimiento, diferentes circunstancias de corte, etc) e indica que no se produjo atrofia por el tratamiento. Los datos de la carga de placas se relacionaron con el tamaño de la región individual del corte para poder manejar los artefactos, plegamientos o trozos que faltaran. El tratamiento con una dosis elevada de 6F6 (grupo D), produjo un descenso significativo del porcentaje del área de las placas del hipocampo y del córtex comparada con el tratamiento con 6F6 a dosis bajas (grupo A; ANOVA: córtex y hipocampo: $p < 0,01$) y grupo de control B (Figura 2). Se dio la misma tendencia en el número de placas por mm² que de nuevo fue menor en el grupo de tratamiento con 6F6 D comparado con el grupo de control B (prueba t: córtex: $p = 0,093$) y grupo de tratamiento con dosis baja con 6F6 A (prueba t: hipocampo: $p = 0,051$; Figura 3). El tamaño medio de las placas permaneció sin cambios entre todos los grupos de tratamiento.

- 55 **Demostración de amiloidosis en los ojos de factor de ratones sin complemento H: un modelo de AMD "seca".**

Animales

Se alojaron ratones de diez semanas, 3 meses, 6 meses, 9 meses y un año de edad *cfh*^{-/-} (*n*=6) (cruzados con el historial genético C57BL/6 durante más de 10 generaciones) y ratones de la misma edad con C57BL/6 normal (*n*=6) en un entorno de temperatura controlada con un ciclo de 12 horas de día (160 lux) y noche y se mantuvieron con una dieta de laboratorio normal (se les administró pienso de laboratorio a voluntad). Los ratones se anestesiaron (0,75 ml de Ketamina, 0,5 ml de Domitor, 0,75 ml de agua estéril a 0,2 ml/100 g, i.p. suplementado según fuera necesario) y se dilataron las pupilas con tropicamida tópica al 1 % y clorhidrato de fenilefrina al 2,5 % 10-15 minutos antes de la obtención de imágenes con cSLO. Antes de cada secuencia de obtención de imágenes, se introdujeron gotas de hidroxipropilmetilcelulosa (0,3 %) en el ojo para evitar la desecación. Todos los procedimientos experimentales cumplían y se realizaron según la normativa de la United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act de 1986.

Obtención de imágenes de la retina

La obtención de imágenes se realizó en ratones de 3 meses, 6 meses y 12 meses *cfh*^{-/-} (*n*=12) y ratones de control de la misma edad (*n*=6) tal como se describe en detalle más adelante. Se adquirieron las imágenes de retina de alta resolución y alto contraste con un oftalmoscopio de láser de barrido confocal tal como se describe más adelante. De forma resumida, se realizó una obtención de imágenes por reflectancia usando haces de láser de 488 y 820 nm. Las imágenes de autofluorescencia y de angiografía con fluoresceína de la retina de los ratones se registraron usando 488 nm. La excitación y el filtro de corte de emisiones estándar integrado con el borde de barrera (valor de 50 % de la transmisión) a 498 nm.

Los ratones se anestesiaron (0,75 ml de Ketamina, 0,5 ml de Domitor, 0,75 ml de agua estéril a 0,2 ml/100 g, i.p. suplementado según fuera necesario) y se dilataron las pupilas con tropicamida tópica al 1 % y clorhidrato de fenilefrina al 2,5 % 10-15 minutos antes de la obtención de imágenes. Antes de cada secuencia de obtención de imágenes, se introdujo una gota de hidroxipropilmetilcelulosa (0,3 %) en el ojo para evitar la desecación. Las imágenes de alta resolución y alto contraste de la retina se adquirieron *in vivo* con un oftalmoscopio de láser de barrido confocal (Heidelberg Retina Angiograph, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania) usando una modificación de los procedimientos descrito (Guo L, Salt TE, Maass A, Luong V, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF (2006) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 626-633). De forma resumida, el diámetro del orificio se redujo a 100 µm para mejorar la resolución axial y se aumentó la potencia del láser para mejorar la proporción entre señal y ruido. La potencia medida en la pupila del ratón era de 1400 W a 488 nm. Se proporcionó al ratón una lentilla de contacto planocóncava especialmente diseñada y se proporcionó potencia óptica usando un objetivo de microscopio de 50 aumentos con una distancia de trabajo muy grande, que mejoró la potencia de resolución óptica y permitió la detección de estructuras microcapilares desde un tamaño de 3 µm de diámetro. Se registraron cortes de imágenes tomográficas en las que el plano axial se movía secuencialmente a intervalos de 15 µm, del humor vítreo a la esclerótica y de central a periférico para visualizar la vasculatura retiniana del plexo primario al plexo exterior. Todas las secuencias de imágenes se capturaron a 8,9 Hz, campo de visión de 10°, y se digitalizaron en forma de archivos de imágenes de 8 bits y 768 x 768 píxeles, que producía una resolución de imágenes lateral de 1,2 µm/píxel. La resolución axial medida en el ojo de ratón era de 5-8 µm.

Las diferencias entre los animales *cfh*^{-/-} y los de control con la misma edad en el número de depósitos autofluorescentes subretinianos al nivel del RPE se analizaron aplicando la prueba t de Student no pareada a los datos de las imágenes SPSS (Chicago, IL).

Histología e inmunohistoquímica

De forma resumida, los animales se anestesiaron profundamente con ketamina y dormitor y después se perfundió a los ratones *cfh*^{-/-} de diez semanas (*n*=6), 3 meses (*n*=3), 6 meses (*n*=3) 9 meses (*n*=3) y ratones *cfh*^{-/-} de 1 año de edad (*n*=6) con PBS 0,1 M, seguido de paraformaldehído al 4 % (en PBS 0,1 M, a pH 7,2). Se sacaron los ojos y se introdujeron en paraformaldehído al 4 % antes de la crioprotección en solución de sacarosa al 30 % (en tampón de PBS 0,1 M) y se dejó durante 24 h a 4 °C. El cristalino se eliminó mediante una incisión en la córnea y los ojos se congelaron rápidamente en compuesto OCT y se seccionaron a un grosor de 10 µm para el análisis inmunohistoquímico, véanse los detalles más adelante. La retina neural y las coroides de los animales seleccionados se separaron y se montaron planas de forma independiente. Se incubaron secciones oculares de ratones *cfh*^{-/-} (*n*=20) y ratones de control de la misma edad (*n*=20) se incubaron con anticuerpos primarios, (Tabla 5) seguido de los anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia y DAPI para teñir los núcleos, véanse los detalles más adelante.

La inmunohistoquímica se realizó a temperatura ambiente y se llevó a cabo en secciones de criostato de 10 µm de grueso de los ojos fijados en 4 % de paraformaldehído. Las secciones de retina se bloquearon durante 1 hora en suero de burro normal al 5 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M, a pH 7,4, con 0,3 % de Triton X-100, y se incubó toda la noche con anticuerpos primarios, diluidos con suero de burro normal al 1 % en PBS 0,1 M con 0,3 % de Triton X-100. Las diluciones de cada anticuerpo primario eran las que se describen más adelante. La exposición a anticuerpo primario se continuó con un lavado y, cuando era necesario, se conjugaron fluorescentemente a anticuerpos secundarios apropiados (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., anticuerpo de burro contra sc-2099 de ratón en PBS con 0,3 % de Triton y 2 % de suero normal (dilución 1:100, mismos diluyentes que en los primarios) y los cortes se expusieron durante 2 horas, (FITC Santa Cruz, Biotechnology, Inc., anticuerpo de

burro contra sc-2099 de ratón). Los controles negativos estaban constituidos por anticuerpo del mismo isotipo pero sin relación o se omitía el anticuerpo primario. Los núcleos se tiñeron posteriormente con 0,5 ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (1 µl de solución madre de DAPI a 5 ml de PBS 0,1 M; Sigma-Aldrich) durante 1 minuto. Después los cortes se lavaron varias veces con PBS 0,1 M seguido de cuatro lavados en solución salina de tampón Tris (a pH 7,4) y finalmente se montaron cubres de vidrio en VECTASHIELD (Vector Laboratories).

Los cortes se observaron y las imágenes se capturaron o bien en un microscopio confocal de barrido por láser (Leica SP2; Leitz) a 8 bites/canal y 1024x1024 píxeles, o un microscopio de campo brillante para Epi-fluorescencia (Olympus BX50F4, Olympus, Japón), donde los datos se capturaron en forma de imágenes a color de 24 bites a una resolución de 3840x3072 px usando una cámara Nikon DXM1200 (Nikon, Tokio, Japón).

10 Anticuerpos primarios disponibles comercialmente

Se usó C3 (anticuerpo de cabra contra ratón conjugado con FITC, dilución 1:100; ICN Biomedicals) para teñir los cortes de retina a las diluciones que se indica.

Anticuerpos contra β -amiloide que se usaron en este trabajo:

- (1) Ab policlonal de conejo específico para amiloide beta de roedor Covance SIG-39153, recomendado para usar en cortes embebidos en parafina IHC a una dilución de 1/250,
- (2) Ab monoclonal de ratón, (IgG2b), Calbiochem NE1002 (4G8) que reconoce tanto amiloide beta humano como de ratón, recomendado para usar cortes embebidos en parafina IHC a una dilución de 1/100 – 1/1000, (es necesario el pretratamiento con ácido fórmico),
- (3) Ab policlonal de conejo Abcam ab2539 que reconoce tanto amiloide beta humano como de ratón , recomendado para usar en cortes embebidos en parafina IHC a una dilución de 1/100, (requiere recuperar el antígeno por medios térmicos antes del procedimiento de tinción IHC),

Anticuerpos secundarios disponibles comercialmente

Tabla 5: Anticuerpos secundarios disponibles comercialmente que se usaron en este trabajo

Ab de burro contra IgG de ratón con FITC	Santa Cruz Biotech inc.	sc-2099	1:300
Ab de burro contra IgG de conejo con FITC	Santa Cruz Biotech inc.	sc-2090	1:300
Fragmento de Ab de cabra contra IgG de ratón Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11017	1:2000

25 **Detección de depósitos drusenoides en ratones $cfh^{-/-}$.**

Los depósitos autofluorescentes pueden detectarse en la retina de ratones $cfh^{-/-}$ viejos. El lípido fluorescente, los depósitos de tipo drusenoides pueden detectarse primeramente aproximadamente a las 14 semanas de edad en los ratones $cfh^{-/-}$ y su presencia aumenta con la edad y está localizada en el espacio subretiniano (lado apical de RPE). Estos depósitos también están presentes en los ratones de tipo silvestre, pero con un grado significativamente menor. Por ejemplo, una imagen por cSLO de la retina de un ratón $cfh^{-/-}$ de 6 meses de edad identifica algunos puntos blancos autofluorescentes en un fondo gris y estos pueden observarse en un frotis de retina *in vitro* para IHC con aumentos de 10x y 40x, como depósitos autofluorescentes fácilmente identificables en el canal verde (FITC). Hay grandes variaciones en los espectros de emisión de fluorescencia entre los depósitos autofluorescentes, (no se muestran datos).

Cuando los cortes de la retina de los ratones $cfh^{-/-}$ se examinan mediante autofluorescencia IHC, pueden observarse depósitos de tipo drusenoides asociados a los sitios de deposición de complemento C3 en el espacio subretiniano de la parte apical de las células de RPE. Esto puede observarse en los ratones $cfh^{-/-}$ de 12 meses de edad (no se muestran datos).

Análisis de ojos de ratones $cfh^{-/-}$ con Ab contra amiloide beta disponibles comercialmente.

Se usaron cortes disponibles comercialmente de cerebros de Alzheimer humano cuya tinción para A β dio positivo (Abcam ab4582), para comprobar la reactividad cruzada de tres Ab contra amiloide beta disponibles comercialmente que se muestran en la Tabla 6.

El procedimiento que se usó para ello era:

Para cortes de cerebro en parafina:

1. Xileno - 10 minutos

2. 100 % de etanol - 8 minutos

3. 95 % de etanol - 5 minutos

4. Agua destilada - 5 minutos

5. Recuperación de antígenos;

5 - Ab2539 HIER con tampón de citrato

- NE1002(4G8) - 70 % de ácido fórmico

- SIG-39153

Para los cortes en parafina y congelados;

6. Lavar con PBS, 3 veces durante 5 minutos cada uno

10 7. Bloquear con 5 % de suero de burro normal durante 1 hora

8. Lavar brevemente con PBS

9. Aplicar anticuerpo primario a;

- Ab 2539 - 1:100

- NE1002 (4G8) - 1:200

15 - SIG-39153 - 1:250

Incubar toda la noche

10. Lavar con PBS, 3 veces a 5 minutos cada una

11. Aplicar anticuerpo secundario a

Para ab2539 – Ab sc-2090 1/100

20 Para NE1002 – Ab sc-2099 1/100

Para SIG-39153 - Ab sc-2090 1/100

Incubar durante 1 hora

12. Lavar con PBS, 3 veces durante 5 minutos cada uno

13. DAPI durante 1 minuto

25 12. Lavar con PBS, 3 veces

13. Lavar con TBS, 4 veces a 5 minutos cada una

14. Montar, colocar un cubreobjetos y sellar.

Tal y como se esperar, solo los anticuerpos primarios que podían reaccionar de forma cruzada con beta amiloide humano (NE1002 [4G8], y ab2539), dieron una detección positiva de las placas de amiloide beta humanas en el tejido de cerebro de Alzheimer humano (no se muestran datos).

30

Detección de amiloide beta en los ojos ratones cfh^{-/-} viejos (>1 año de edad) y de 10 semanas de edad usando Ab disponibles comercialmente.

Tabla 6: Anticuerpos primarios contra amiloide beta que se usaron en este estudio

Anticuerpo policlonal de conejo contra beta amiloide	AbCam Ltd.	ab2539	1:100
mAb de ratón contra β -amiloide	Calbiochem Inc.	NE1002	1:100
Anticuerpo policlonal purificado contra A β de roedor	Covance Inc.	SIG-39153	1:100

Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Secar al aire los portaobjetos durante varias horas
2. Lavar 3 veces
3. Bloquear con 5 % de NDS durante 1 hora
- 5 4. Preparar los anticuerpos primarios de la Tabla 6 de la forma siguiente;
 - a. SIG39153 - 1:250
 - b. NE1002 (4G8) - 1:200
 - c. Ab2539 1:500
5. Lavar brevemente e incubar con los anticuerpos primarios toda la noche
- 10 6. Lavar 3 veces
7. Preparar los anticuerpos secundarios de la forma siguiente;
 - a. contra conejo con FITC
 - b. contra ratón con FITC

Incubar durante 1 hora

- 15 8. Lavar 3 veces
9. Aplicar DAPI durante 1 minuto
10. Lavar 3 veces con PBS
11. Lavar 4 veces con TBS
12. Montar, colocar un cubreobjetos y sellar

- 20 Se examinó tejido ocular inicialmente fijado de ratones *cfh*^{-/-} de la misma edad y controles compañeros de camada de tipo silvestre, (C57Bl/6) de 12-13 meses de edad usando los tres anticuerpo primarios contra β -amiloide disponibles comercialmente, (Ab), descritos anteriormente. Cada Ab primario se detectó usando el Ab secundario relevante marcado con fluorescencia. Para el Ab SIG39153, no fue posible detectar ninguna señal en ninguno de los tejidos, a pesar de seguir el protocolo recomendado por el fabricante, (como en las muestras de cerebro descritas
- 25 anteriormente), (no se muestran datos). Sin embarog, fue posible detectar amiloide beta específicamente en la retina de ratones *cfh*^{-/-} viejos, (pero no en los compañeros de camada de tipo silvestre), usando los dos anticuerpos primarios contra β -amiloide beta disponibles comercialmente. Un ejemplo de estos datos se muestran en la Figura 4, en la que el panel (A) muestra tejido retiniano de un ratón de tipo silvestre viejo y el panel (B) muestra tejido de un ratón *cfh*^{-/-} viejo ambos sondados con ab2539 como Ab primario; y el panel (C) muestra tejido retiniano de un ratón de tipo silvestre viejo y el panel (D) muestra tejido de un *cfh*^{-/-} viejo ambos sondados con NE1002 (4G8) como Ab primario. Los datos demuestran que amiloide-beta se deposita en torno a la membrana de Bruch específicamente en ratones *cfh*^{-/-} viejos. La señal positiva de reactividad cruzada de los anticuerpos contra amiloide beta depositado en la interfaz entre el RPE / y la membrana de Bruch puede observarse en forma de una franja blanca intensa señalada por las flechas blancas de la Figura 4 (B) y (D). También pueden observarse algunos depósitos amiloides en el área de la capa de las fibras nerviosas y las células ganglionares del ojo de los ratones *cfh*^{-/-} por ejemplo, la señal blanca marcada con una flecha blanca en la parte superior de la Fig. 4 (B)
- 35

- Posteriormente, se examinó tejido ocular retiniano fijado de ratones *cfh*^{-/-} de 10 semanas de edad y controles compañeros de camada de tipo silvestre de la misma edad, (C57Bl/6) usando anticuerpos primarios NE1002 (4G8) y ab2539 contra β -amiloide. De nuevo, el amiloide beta podía detectarse específicamente en la retina de los ratones *cfh*^{-/-}, pero no en los compañeros de camada de tipo silvestre (no se muestran datos). Los datos demuestran que la deposición de amiloide beta se produce el 10 % de la retina en los ratones *cfh*^{-/-} de 10 semanas de edad (n=3), (no se muestran datos). La deposición se produce principalmente en el lado basal de la capa epitelial del pigmento retiniano (RPE) y aparece asociada a depósitos laminares basales, (no se muestran datos). Obsérvese que la deposición de amiloide beta a las 10 semanas de edad es similar al tiempo en el que se deposita el 'drusenoide' autofluorescente, y los depósitos de complemento C3 aparecen primero en el ratón *cfh*^{-/-}.
- 40
- 45

Reactividad cruzada de 6F6 con amiloide beta en la retina de los ojos de ratones *cfh*^{-/-}

Anticuerpos primarios que se usaron en este estudio.

- (i) Ab monoclonal 6F6 de ratón, IgG2a,
- (ii) Ab monoclonal de ratón isotipo IgG2a de control, (reactivo del laboratorio específico para el antígeno citosina desaminasa,
- (iii) Ab monoclonal de control de isotipo de ratón IgG2a, kappa [MOPC-173], (ab18413, Abcam), clon derivado de mieloma en Balb/c de especificidad desconocida

Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Secar al aire los portaobjetos durante varias horas
2. Lavar con 1XPBS, 3 veces a 5 minutos cada una
3. Bloquear con 5 % de suero de burro normal en 0,3 % de Triton X-100 en PBS, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
4. Preparar el anticuerpo primario, diluyendo con 1 % de suero de burro normal en 0,3 % de Triton X-100 en PBS
 - a. monoclonal de ratón contra amiloide Beta 6F6i) – 1:1000, 1:2000 y 1:4000
 - b. IgG2a de ratón de control ii) 1:1000 ,1:2000 y 1:4000

Lavar brevemente

5. Aplicar el anticuerpo primario e incubar toda la noche a temperatura ambiente

Al día siguiente;

1. Lavar con 1X PBS, 3 veces a 5 minutos cada una
2. Preparar los anticuerpos secundarios diluyendo en 1 % de suero de burro normal en 0,3 % de Triton X-100 en PBS
 - a. Alexa Fluor 488 de cabra contra ratón (1:2000)

- Aplicar el anticuerpo secundario e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente

3. Lavar con 1 X PBS, 3 veces a 5 minutos cada uno
4. Aplicar DAPI, 1:5000 en PBS e incubar durante 1 minuto en un lugar oscuro
5. Lavar con 1 X PBS, 3 veces durante 5 minutos cada una
6. Lavar con 1XTBS, 4 veces a 5 minutos cada una

7. Montar con Vectashield, colocar un cubreobjetos y sellar.

Se examinó tejido ocular inicialmente fijado de ratones *cfh*^{-/-} de la misma edad y controles compañeros de camada de tipo silvestre, (C57Bl/6) de 12-13 meses de edad como se describe anteriormente. Aunque apareció reactividad cruzada de 6F6 en un área similar de la retina a la que se detectó mediante los Ab contra amiloide beta comerciales, se produjo una reactividad cruzada similar con el anticuerpo de control aunque parte de esto puede deberse a una reactividad cruzada de ruido de fondo del Ab secundario solo. También pudo observarse alguna tinción de ruido de fondo en las muestras de tipo silvestre.

Para resolver la tinción de fondo descrita anteriormente, se repitió el experimento, pero el anticuerpo secundario se cambió de un Ab contra IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488, a una molécula marcada con FITC. También el anticuerpo primario de control se cambió a un control de isotipo (iii) disponible comercialmente.

- El procedimiento que se usó para este experimento era:

Secar al aire los portaobjetos durante varias horas

Lavar con 1XPBS, 1 vez a 5 minutos

Bloquear con 5 % de suero de burro normal en 0,3 % de Triton X-100 en PBS, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente

- Preparar el anticuerpo primario, diluyendo con 1 % de suero de burro normal en 0,3 % de Triton X-100 en PBS

- a) ab18413 contra IgG2a de ratón, Kappa 1:100

Lavar brevemente

Aplicar el anticuerpo primario e incubar toda la noche a temperatura ambiente

Al día siguiente;

Lavar con 1X PBS, 3 veces a 5 minutos cada una

- 5 Preparar los anticuerpos secundarios diluyendo en 1 % de suero de burro normal en 0,3 % de Triton X-100 en PBS

b) Ab de burro contra ratón con FITC (1:300)

Aplicar el anticuerpo secundario e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente

Lavar con 1 X PBS, 3 veces a 5 minutos cada uno

Aplicar DAPI, 1:5000 en PBS e incubar durante 1 minuto en un lugar oscuro

- 10 Lavar con 1 X PBS, 3 veces durante 5 minutos cada una

Lavar con 1XTBS, 4 veces a 5 minutos cada una

Montar con Vectashield, colocar un cubreobjetos y sellar.

- 15 Un ejemplo de los datos con el procedimiento de tinción anterior se muestra en la Figura 5. El panel (A) muestra los datos obtenidos usando 6F6 como primario a una dilución de 1 en 4000 para teñir un corte de la retina de un ratón *cfh*^{-/-} viejo y el panel (B) muestra los datos obtenidos usando un control de isotipo (iii) como primario, (a una dilución p/v similar a la de 6F6), para teñir un corte de la retina de un ratón *cfh*^{-/-} viejo (control negativo de *cfh*^{-/-} comercial marcado), y el panel (C) muestra los datos obtenidos usando 6F6 como primario a una dilución de 1 en 4000 para teñir un corte de la retina de un ratón de control de tipo silvestre de la misma edad y el panel (D) muestra los datos obtenidos usando el control de isotipo (ii) (control negativo de *cfh*^{-/-} marcado) como primario a una dilución de 1 en 4000 para teñir un corte de la retina de un ratón *cfh*^{-/-} viejo.
- 20

- 25 Los datos confirman que 6F6 es capaz de detectar específicamente amiloide beta depositado en la retina de ratones *cfh*^{-/-}, (Fig. 5 A), no presentes en los ratones de tipo silvestre en de la misma edad, (Fig. 5 C). La especificidad de 6F6 se confirmó por la completa ausencia de tinción usando un control de isotipo disponible comercialmente como primario, a una dilución de p/v similar a la de 6F6, (Fig. 5 B). Los datos obtenidos usando otro anticuerpo de control de isotipo del laboratorio (ii) a una dilución de 1 en 4000 (Fig. 5 D), sugirieron una tinción retiniana específica en los ratones *cfh*^{-/-}. Sin embargo, esto puede explicarse por la especificidad de este anticuerpo del mismo isotipo dado que la citosina desaminasa es un marcador de la descomposición celular que bien podría producirse en la retina de ratones *cfh*^{-/-} viejos. En retrospectiva esta no fue una elección apropiada para el control de un Ab específico de isotipo en este experimento.

- 30 **Reactividad cruzada en el tiempo de amiloide en la retina de los ojos de ratón *cfh*^{-/-} a 6F6 y 4G8.**

- 35 Se analizaron de forma similar ratones C57Bl/6, (de tipo silvestre) y *cfh*^{-/-} de la misma edad mediante inmunohistoquímica en tiempos intermedios entre los de las 10 semanas y los 12 meses: 3 meses de edad (*n*=3) 6 meses de edad (*n*=3) y 9 meses de edad (*n*=3). El análisis se realizó usando o bien 6F6 o Calbiochem NE1002 (4G8) como anticuerpo de detección primario. A los tres meses de edad podía observarse poca diferencia entre los ratones de tipo silvestre y *cfh*^{-/-} a nivel macro. Sin embargo, para los seis meses de edad: era posible detectar claramente depósitos amiloides alrededor del borde de la membrana de Bruch y las células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) en los ratones *cfh*^{-/-} pero no en los ratones de control de tipo silvestre de la misma edad, (no se muestran datos). En el tiempo de los seis meses, la tinción usando 4G8 parecía cubrir todo el borde entre el RPE y la BM, mientras que la tinción similar usando 6F6 como anticuerpo primario era más puntual, (no se muestran datos).
- 40 En el tiempo de los seis meses de edad se observó una clara distinción por IHC del nivel de los depósitos amiloides en la retina de los ratones *cfh*^{-/-} comparada con la de los controles de tipo silvestre de la misma edad.

- 45 En resumen, los ratones *cfh*^{-/-} representan un modelo rápido de amiloidosis en el ojo, especialmente en la retina y esto podría estar muy relacionado con el modelo de fenotipo de ADM "seca". Los ratones representarían un buen modelo para el análisis del efecto de los Ab terapéuticos contra amiloide beta como 6F6 para amiloide beta en la retina.

Demostración de la capacidad de 6F6 de interferir con la unión de amiloide beta a factor de complemento I.

- 50 Los datos recientemente publicados que muestran la interacción directa entre amiloide beta y el factor de complemento I, (CFI), la "pareja" y el cofactor para el factor de complemento H, (CFH), (Wang, J. y col., 2008), podría ayudar a explicar la rápida deposición de amiloide beta en la retina de los ratones *cfh*^{-/-}. En ausencia de CFH, amiloide beta sería libre de unirse a cualquier CFI "desemparejado" de la retina del ratón (Wang, J. y col., 2008, datos sin publicar). Para demostrar que el anticuerpo terapéutico contra β -amiloide, 6F6, o un equivalente

humanizado podría interferir con la interacción entre amiloide beta y CFI mediante la unión a amiloide beta; podría realizarse una serie de experimentos similares a los descritos por Wang, J. y col., 2008. El efecto de la preincubación de 6F6 con preparaciones disponibles comercialmente de proteína amiloide beta, (por ejemplo del Peptide Institute), sobre su capacidad de unirse a la proteína CFI disponible comercialmente, (Quidel Corporation), en presencia y ausencia de proteína CFH disponible comercialmente, (Quidel Corporation) podría determinarse tal como se ha descrito, (Wang, J. y col., 2008, páginas 716-717), y analizarse o bien mediante estudios de coimmunoprecipitación estándar y/o mediante análisis por BiaCore. De forma similar, podría determinarse la capacidad del anticuerpo 6F6 de alterar un amiloide beta preformado: complejo de CFI en presencia y ausencia de CFH podría evaluarse mediante estudios de coimmunoprecipitación y/o mediante análisis por BiaCore. De forma similar, el efecto de la preincubación de 6F6 con preparaciones disponibles comercialmente de proteína amiloide beta, (por ejemplo del Peptide Institute), sobre su capacidad de afectar a la función de la proteína CFI disponible comercialmente, (Quidel Corporation), en presencia y ausencia de proteína CFH disponible comercialmente, (Quidel Corporation) podría medirse usando un ensayo de escisión de C3b de complemento, (Quidel Corporation) tal como se ha descrito, (Wang, J. y col., 2008, página 717), y analizarse mediante un SDS PAGE estándar. De forma similar, podría determinarse la capacidad del anticuerpo 6F6 de alterar un amiloide beta preformado: complejo de CFI en presencia de CFH y por lo tanto regenerar la función de escisión de C3b al complejo de CFI/CFH tal como se ha descrito, (Wang, J. y col., 2008, página 717), y analizarse mediante un SDS PAGE estándar.

Se sugirió que los resultados del estudio *in vitro* recientemente publicado apoyaban la hipótesis de que el amiloide beta activa el sistema de complemento I del drusen bloqueando la función del factor de complemento I provocando una inflamación crónica de menor grado en los tejidos subretinianos; relacionando así cuatro de los factores asociados al desarrollo de la AMD: inflamación, activación de complemento, depósito de amiloide beta y drusen, (Wang, J. y col., 2008). Anteriormente nunca se habían documentado estos indicios directos del efecto de amiloide beta en la activación de la ruta de complemento alternativa puede potencialmente competir con el factor de H alternativo por la unión al factor de complemento I, (Wang, J. y col., 2008). La interferencia con el efecto negativo de amiloide beta sobre el aclaramiento de los componentes C3 de complemento mediante la administración terapéutica de un anticuerpo tal como 6F6 podría constituir un mecanismo de acción novedoso para detener o invertir la AMD.

Detección de la deposición de amiloide beta en ojos humanos viejos usando tinción con tioflavina T y reactividad cruzada con 6F6.

Se obtuvieron muestras de tejido ocular de donante humano de Moorfields Eye Bank, Moorfields Eye Hospital, Londres, Reino Unido. La primera muestra obtenida fue la de un hombre blanco de 65 años de edad, (Moorfields Eye Bank, Moorfields Eye Hospital, Londres, Reino Unido). Los ojos se fijaron y procesaron tal como se ha descrito anteriormente y los cortes se sometieron a tinción con tioflavina T, (Sigma T3516), usando un protocolo publicado anteriormente, (Anderson y col., Exp Eye Res (2004), 78; 243-256; Levine, H, Methods in Enzymology (1999), 309; 274-284. Los datos de tinción con tioflavina T generados con el tejido ocular mostraron una señal fluorescente de amiloide beta unida a tioflavina T que podía observarse en forma de una tenue mancha blanca en torno a los depósitos laminares basales y Drusen en torno a la interfaz entre el RPE y la membrana de Bruch en la retina exterior humana del tejido ocular.

Se obtuvieron muestras adicionales de tejido ocular de donante humano del Moorfields Eye Bank, Moorfields Eye Hospital, Londres, Reino Unido, que incluían las de un hombre de 41 años de edad y uno de 90 años de edad. Estos ojos de nuevo se fijaron y procesaron tal como se ha descrito anteriormente, pero esta vez, los cortes se sometieron a tinción con 6F6 como anticuerpo primario y se visualizaron usando un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado con FITC, tal como se describe anteriormente. Aunque la muestra del ojo de 90 años de edad había perdido la mayor parte de la retina durante el procesamiento, fue posible detectar reactividad cruzada de amiloide por 6F6, en los segmentos exteriores del tejido que quedaba. Esta tinción no estaba presente ni en los segmentos externos ni en la retina del ojo del hombre de 41 años de edad. A los donantes humanos de tejido ocular no se les había diagnosticado formalmente AMD pero la presencia de grandes depósitos laminares basales y también su asociación con amiloide beta sugiere con fuerza la etiología de la AMD seca temprana en el tejido ocular teñido con tioflavina T del hombre de 65 años de edad. Aunque en la muestra del ojo de 90 años de edad el procesamiento del tejido había perdido la mayor parte de la retina, el hecho de que la reactividad cruzada de amiloide por 6F6 pudiera detectarse en el resto del tejido pero no en ninguno de los segmentos exteriores ni en la retina del ojo de un hombre de 41 años de edad, (que se supone que es demasiado joven para presentar los síntomas de la AMD), es buen presagio del uso de los anticuerpos de tipo 6F6 para la unión al amiloide que se encuentra en los ojos humanos viejos.

Clonación de regiones variables de hibridomas

Secuencias de las regiones variables

Se extrajo el ARN total de todas las líneas celulares de los hibridoma y después se generaron secuencias de ADNc de los dominios variables pesados y ligeros mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El cebador directo para la RT-PCR era una mezcla de cebadores degenerados específicos para las secuencias líder de los genes de las inmunoglobulinas y el cebador inverso era específico para la regiones constantes del anticuerpo, de forma que por ejemplo para 6F6 el isotipo IgG2a murino para la cadena pesada y

kappa murino para la cadena ligera. Los cebadores se diseñaron de acuerdo con la estrategia que describen Jones y Bendig (Bio/Technology 9:88, 1991). La RT-PCR se realizó por duplicado para ambas secuencias de la región V para permitir la posterior verificación de las secuencias de la región V correctas. Se clonaron los productos de la región V generados por RT-PCR (Invitrogen TA Cloning Kit) y se obtuvieron los datos de las secuencias.

5 Secuencia de aminoácidos de V_H de 6F6 (SEC ID N°: 19)

EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTGSGFNIKVVYVHWLQKLTEQGLEWIGRIDPENGETIYTPKFQDKATLTVDTSSNT
AYLQLSSLTSEDAVYYCVSSGYWGQGTTLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 6F6 (SEC ID N°: 20)

10 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGGAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTT
CTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATGTGCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGA
AGGATTGATCCTGAAAATGGTGAACTATATATACCCGAAATTCAGGACAAGGCCACTTTGACAGTAGACACA
TCATCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACGCTGCCGTGTACTATTGTGTTAGTTC
GGGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 6F6 (SEC ID N°: 21)

15 DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQPPQLLIYQMSNLASGVPDRFTSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 6F6 (SEC ID N°: 22)

20 GATATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGCAAGAGTCTCCTACATAGGAATGGCATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCTCAA
CTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTAGCAGTGGGTCAGGAACTGA
TTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTG
GACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 2C1 (SEC ID N°: 31)

25 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKVVYVHWLQKLTEQGLEWIGRIDPENGETIYAPKFQDKATLTVDTSSNT
AYLQLSSLTSEDAVYYCVSSGYWGQGTTLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 2C1 (SEC ID N°: 32)

30 GAGGTTTCAGCTACAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTT
CTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATGTGCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGA
AGGATTGATCCTGAAAATGGTGAACTATATATGCCCCGAAATTCAGGACAAGGCCACTTTGACAGTAGACACA
TCATCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGTTAGTTG
GGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 2C1 (SEC ID N°: 33)

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFTSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

35 Secuencia de ADN de V_L de 2C1 (SEC ID N°: 34)

40 GATATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGTAAGAGTCTCCTACATAGGAATGGCATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAG
CTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTAGCAGTGGGTCAGGAACTGA
TTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTG
GACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 2E11 (SEC ID N°: 35)

EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCTASGFNIKVVYIHWLQKLTEQGLEWIGRIDPENGETKYVPKFQDKATLTVDTSSNT
AYLHLSSLTSEDTGVYYCVTSGYWGQGTTLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 2E11 (SEC ID N°: 36)

45 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGGTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATATCCACTGGTTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTAGAATGGATTGGAA
GGATTGATCCTGAAAATGGTGAACTAAGTATGTCCCGAAATTCAGGGCAAGGCCACTTTAACAGTAGACACAT
CCTCCAACACAGCCTACCTGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGGCGTCTATTACTGTGTTACCTCG
GGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 2E11 (SEC ID N°: 37)

DIVMTQAAFSNPVALGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTL
RISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 2E11 (SEC ID N°: 38)

5 GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCGCTCTTGGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAG
CTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCTAGCAGTGGGTCAGGAACTGA
TTTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTG
GACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA

10 Secuencia de aminoácidos de V_H de 4D4 (SEC ID N°: 39)

EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTGSGFNIKVYYVHWLQKLTQGLEWIGRIDPENGETLYTPKFQGKATLTVDTSSNT
AYLQLNSLTSEDVAVYYCVSSGYWGQGTSLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 4D4 (SEC ID N°: 40)

15 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGGAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCTGACAGGTT
CTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATGTTCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGA
AGGATTGATCCTGAGAATGGTGAACCTCTATACACCCCGAAATCCAGGGCAAGGCCACTTTGACAGTAGACAC
ATCATCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGTTAGTTC
GGGCTACTGGGGCCAAGGCACCTCTCTCAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 4D4 (SEC ID N°: 41)

20 DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFTSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 4D4 (SEC ID N°: 42)

25 GATATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGCAAGAGTCTCCTACATAGGAATGGCATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAG
CTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCTAGCAGTGGGTCAGGAACTGA
TTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTG
GACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 5C9 (SEC ID N°: 43)

30 EVQLQQSGAEFVRPGASVKLSCTASGFNIKYIHWLQKRTDQGLEWIGRIDPEDGETKFGPKFRGKATLTADTSSNT
ASLQLSSLTSEDVGVYYCVTSGYWGQGTSLVSS

Secuencia de ADN de V_H de 5C9 (SEC ID N°: 44)

35 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGTTTGTGAGGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTATCCTGCACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAACAACTACTATATACACTGGCTGAAACAGAGGACTGACCAGGGCCTGGAGTGGATTGGA
AGGATTGATCCCGAGGATGGTGAACCTAAATTTGGCCCGAAATCCGGGGCAAGGCCACTTTAACAGCAGACAC
ATCCTCCAACACAGCCTCCCTACAACCTCAGCAGTCTGACATCTGAGGACACTGGCGTCTATTACTGTGTTACCTC
GGGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCTCAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 5C9 (SEC ID N°: 45)

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTL
RISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

40 Secuencia de ADN de V_L de 5C9 (SEC ID N°: 46)

45 GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACATCAGCCTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAG
CTCTTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCTAGCAGTGGGTCAGGAACTGA
TTTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTG
GACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 5D1 (SEC ID N°: 47)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKVYYVHWLQKLTQGLEWIGRIDPENGETKYAPKFQDKATLTVDTSSN
TAYLHLSSLTSEDVAVYYCVSSGYWGQGTSLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 5D1 (SEC ID N°: 48)

5 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTT
CTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATGTGCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGA
AGGATTGATCCTGAAAATGGTGAAGTAAATATGCCCCGAAATTCAGGACAAGGCCACTTTGACAGTAGACACA
TCCTCCAATACAGCCTACCTTCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGTTAGTTTCG
GGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 5D1 (SEC ID N°: 49)

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFTSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

10 Secuencia de ADN de V_L de 5D1 (SEC ID N°: 50)

15 GACATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGTAAGAGTCTCCTACATAGGAATGGCATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAG
CTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTAGCAGTGGGTGAGGAACTGA
TTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTATTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTG
GACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 14B3 (SEC ID N°: 51)

EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTGSGFNIVYYVHWLQKLEWIGRIDPENGETLYTPKFQGKATFTVDTSSN
TAYLQLSSLTSEDVAVYYCVSSGYWGQGTTLTVSS

14B3 Secuencia de ADN de V_H de (SEC ID N°: 52)

20 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGGAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTT
CTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATGTTCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGA
AGGATTGATCCTGAGAATGGTGAAGTCTATATACCCCGAAATTCAGGGCAAGGCCACTTTTACAGTAGACACA
TCATCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGTTAGTTTCG
GGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

25 Secuencia de aminoácidos de V_L de 14B3 (SEC ID N°: 53)

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFTSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 14B3 (SEC ID N°: 54)

30 GATATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGCAAGAGTCTCCTACATAGGAATGGCATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAG
CTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTAGCAGTGGGTGAGGAACTGA
TTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTG
GACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 16D4 (SEC ID N°: 55)

35 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHVWLQKLEWIGRIDPENGETQYAPKFQGKASLTADTSSN
TAYLHLSSLTSEDVAVYYCVSSGYWGQGTTLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 16D4 (SEC ID N°: 56)

40 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAAGACTACTATATGCACTGGTTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGA
AGGATTGATCCTGAAAATGGTGAAGTCAATATGCCCCGAAATTCAGGGCAAGGCCTCTTTAACAGCAGACACA
TCCTCCAACACAGCCTACCTTCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGTTAGTTTCG
GGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 16D4 (SEC ID N°: 57)

45 DIVMTQAASNPVTLGTSASISCRSSKSLLRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTL
RISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGGKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 16D4 (SEC ID N°: 58)

GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAG
CTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTAGCAGTGGGTGAGGAACTGA

TTTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTG
GACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas en las secuencias de aminoácidos.

Clonación y expresión de la quimera 6F6

- 5 Se generó un anticuerpo quimérico 6F6 (6F6c) constituido por las regiones V murinas progenitoras injertadas en una IgG1 humana para la cadena pesada o regiones C kappa humanas para la cadena ligera para expresar el material de anticuerpo recombinante que podría usarse para confirmar la correcta clonación de las regiones V murinas funcionales. El ADN que codifica las regiones V de la cadena pesada y ligera de 6F6 murino y una secuencia de señal murina (Kabat y col. "Sequences of Immunological Interest", NIH, 1991, Quinta edición, p3.0 95VNP'CL) se
- 10 clonaron en marco en los vectores de expresión de mamífero RLD-bshe (para la cadena pesada) y RLN-bshe (para la cadena ligera) que contiene regiones constantes humanas (Fc de IgG1 inactivado o C kappa humana, respectivamente). Mediante la introducción de un sitio de clonación adecuado, la secuencia de aminoácidos de FR4 (región estructural 4 (secuencia de la región V después de CDR3 y antes del primer dominio constante)) de la secuencia de aminoácidos de V_H se cambió de TTLTVSS como se muestra en la SEC ID N° 19 a TLVTVSS.
- 15 Elementos del vector de expresión RLD-bshe para 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	Estructura total
5077 - 5937 (hebra complementaria)	Beta lactamasa

(la posición de los elementos y el tamaño global del vector que se proporciona anteriormente son únicamente con fines ilustrativos y dependen del tamaño del inserto de las cadenas de anticuerpos)

- 20 Elementos del vector de expresión RLN-bshe para 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	Estructura total
5077 - 5937 (hebra complementaria)	Beta lactamasa

(la posición de los elementos y el tamaño global del vector que se proporciona anteriormente son únicamente con fines ilustrativos y dependen del tamaño del inserto de las cadenas de anticuerpos)

Se identificaron los clones con las secuencias de V_H y V_L correctamente clonadas y se prepararon los plásmidos para la expresión en células CHO. El anticuerpo 6F6c expresado se purificó del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía con proteína A en un sistema de FPLC, y después se analizó para determinar su unión a A β mediante ELISA y SPR usando tecnología Biacore™. Los resultados indicaban que se habían clonado y expresado las regiones V de ratón de 6F6 correctas produciendo un anticuerpo funcional con características similares al anticuerpo murino progenitor 6F6.

Estrategia de humanización de la cadena pesada

Para la secuencia de la cadena pesada variable de ratón de 6F6 se seleccionó una estructura receptora de línea germinal humana (IGHV1-24, SEC. ID. N°: 13) que tenía un 58 % de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia variable de la cadena pesada de 6F6 de ratón (SEC ID N°: 19) junto con el minigen JH4 (Kabat: YFDYWGQGTLVTVSS (SEC ID N°: 15)). Los primeros cuatro restos de los restos del minigen JH4 entran en la región CDR3 que se sustituye por la CDR entrante del anticuerpo donante.

Se generó un conjunto de 34 variantes de cadena pesada variable humanizadas basándose en la comparación de las secuencias y en el posible impacto sobre la función del anticuerpo. Las CDR de la cadena pesada de 6F6 murino (usando la definición de Kabat) (SEC. ID. N°: 1, 2 y 3) se injertaron en la estructura receptora humana seleccionada anteriormente. Se diseñó un número de variantes de cadena pesada variable que comprendían las sustituciones a dos a quince posiciones elegidas de entre las posiciones 1, 5, 13, 24, 27, 28, 29, 30, 37, 40, 41, 48, 66, 67, 69, 71, 75, 76, 93 y 94 (numeración según Kabat) (Tabla 7). Las posiciones 93 y 94 inmediatamente adyacentes a la definición de Kabat de la CDRH3 se incluyeron en todas las variantes estudiadas.

Tabla 7 Lista de contramutaciones de V_H investigadas

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Resto correspondiente en 6F6 murino
1	Q	E
5	V	Q
13	K	E
24	V	G
27	Y	F
28	T	N
29	L	I
30	T	K
37	V	L
40	A	L
41	P	T
48	M	I
66	R	K
67	V	A
69	M	L
71	E	V
75	T	S
76	D	N
93	A	V
94	T	S

Estrategia de humanización de la cadena ligera

Para la secuencia de la cadena ligera variable de ratón de 6F6 se seleccionó una estructura receptora de línea germinal humana (IGKV2-28) que tenía un 79 % de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia variable de la cadena pesada de 6F6 de ratón (SEC ID N°: 21) junto con la región J kappa 1 (Kabat: WTFGQGTKVEIK) basándose en la similitud de las secuencias. Los primeros dos restos de los restos del minigen JK-1 entran en la región de CDR3 y son idénticos a los dos últimos restos de la CDR3 de la cadena ligera de 6F6 de ratón.

Las CDR de la cadena ligera de 6F6 murino (usando la definición de Kabat) (SEC. ID. N°: 4, 5 y 6) se injertaron en la estructura receptora humana seleccionada anteriormente proporcionando una cadena ligera injertada recta variable L0. Además se generó un conjunto de 13 variantes de cadena ligera variable humanizadas basándose en la comparación de las secuencias y en el posible impacto sobre la función del anticuerpo. Se diseñaron las variantes de la cadena ligera variable humanizada se variantes que comprendían sustituciones en de una a cuatro posiciones que se elegían de entre las posiciones; 8, 11, 43, 63, 64, 100 y 104 (numeración según Kabat) (Tabla 8).

Tabla 8 Lista de contramutaciones de V_L investigadas

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Resto correspondiente en 6F6 murino
8	P	A
11	L	N
43	S	P
63	S	T
64	G	S
100	Q (JK-1)	G
104	V (JK-1)	L

Construcción de ADN de cadena pesada y ligera humanizado

Se sintetizaron regiones V humanizadas *de novo* mediante construcción con oligos superpuestos y por amplificación mediante PCR o por mutagénesis dirigida al sitio usando variantes existentes como plantilla. Se incluyeron los sitios de restricción para la clonación en los vectores de expresión de mamífero RLD-bshe y RLN-bshe y una secuencia de señal murina (Kabat y col. "Sequences of Immunological Interest", NIH, 1991, Quinta edición, p3.0 95VNP'CL). Los productos de la PCR que codificaban las regiones V humanizadas junto con las secuencias de señal y los sitios de restricción se clonaron después en marco en los vectores de expresión de mamífero: se clonaron variantes de cadena pesada en RLD-bshe para generar ADN que codificaba cadenas pesadas mutadas de Fc de IgG1 humana de longitud completa; se clonaron variantes de cadena ligera en marco en el ADN que contenía RLN-bshe que codificaba la región constante kappa humana generando ADN que codificaba cadenas ligeras kappa humanas de longitud completa.

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

Se transfectaron células CHOK1 de forma transitoria a pequeña escala inicialmente para evaluar las combinaciones de construcciones de ADN de cadenas pesadas y ligeras humanizadas y en placas de 6 pocillos. Las células CHOK1 se pasaron en DMEM F12, con 5 % de suero bovino fetal con IgG ultra reducida y glutamina 2 mM a confluencia en placas de 6 pocillos. Las células confluentes se transfectaron con un total de 7,5 µg de ADN: 30 µg de lípido de transfección (para un lípido adecuado véase el documento WO2006/053783) en medio Optimem Glutamax (Invitrogen). Las células transfectadas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. A las 72 horas se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron para determinar la concentración de 6 pocillos y después se analizaron para determinar su unión a Aβ humano mediante ELISA.

Los anticuerpos humanizados también se expresaron a gran escala mediante cotransfección de plásmidos de RLD y RLN que codificaban las cadenas pesadas y ligeras en células CHO mediante electroporación. Se seleccionó una población policlonal estable de células que expresaban el anticuerpo apropiado usando un medio sin nucleósidos. El anticuerpo se recuperó y se purificó a partir del sobrenadante mediante FPLC con columnas de ProSepA HiTrap.

Evaluación de variantes de V_H humanizadas en un ELISA de unión de β-amiloide

Se evaluaron 34 variantes de V_H humanizadas expresadas a pequeña escala en cultivos de 6 pocillos para

determinar su unión al péptido A β (1-40) humano. Las 34 cadenas pesadas se analizaron combinadas con la cadena ligera L2 (véase la Tabla 8 a continuación). Algunas combinaciones con L2 sí expresaron el material de anticuerpo pero no se unieron a β -amiloide 1-40 y por lo tanto no pudieron generarse valores de CE50 para estas combinaciones. Cuando fue posible generar valores de CE50, estos diferían entre los experimentos pero variaban desde un aumento de aproximadamente 30 veces en los valores de CE50 a valores idénticos cuando se comparaban con el valor de CE50 de la construcción quimérica usando las regiones V de 6F6 murino contenidas en cada experimento como referencia. Los restos 93 y 94 inmediatamente adyacentes a la definición de Kabat de CDRH3 se mantuvieron en todas las variantes humanizadas. Las posiciones 27-30 que pueden considerarse, en términos estructurales, parte de CDRH1 (Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196(4): 901-917) proporcionaron una mejor unión cuando se contramutaron que las sustituciones en 93 y 94 solas. Era necesaria una contramutación en los dos restos 24 y 37 juntos para proporcionar una unión potente, sin cualquiera de estos dos restos, las variantes humanizadas no se unían de forma eficaz al péptido A β (1-40) en este formato de ELISA y cuando se combinaban con la cadena ligera L2. La Tabla 9 muestra las mejores variantes de V_H humanizadas en términos de propiedades de unión a amiloide basándose en la combinación con la cadena ligera L2.

Tabla 9 Variantes de VH humanizadas seleccionadas

Variante de VH humanizada	Numeración según Kabat	1	5	13	24	27	28	29	30	37	40	41	48	66	67	69	71	75	76	93	94
	6F6	E	Q	E	G	F	N	I	K	L	L	T	I	K	A	L	V	S	N	V	S

	IGHV1-24	Q	V	K	V	Y	T	L	T	V	A	P	M	R	V	M	E	T	D	A	T
H11		-	-	E	G	F	N	I	K	L	L	-	I	K	A	L	V	-	-	V	S
H21		-	-	-	G	F	N	I	K	L	L	-	-	-	-	-	-	-	-	V	S
H23		-	-	-	G	F	N	I	K	L	-	-	I	-	-	-	-	-	-	V	S
H24		-	-	-	G	F	N	I	K	L	-	-	-	-	-	-	-	S	N	V	S
H25		-	-	-	G	F	N	I	K	L	-	-	I	-	-	L	-	-	-	V	S
H26		-	-	-	G	F	N	I	K	L	-	-	I	-	-	L	-	S	-	V	S
H27		-	-	E	G	F	N	I	K	L	-	-	-	K	A	-	V	-	-	V	S
H28		-	-	E	G	F	N	I	K	L	-	-	-	K	A	L	V	-	-	V	S
H29		-	-	-	G	F	N	I	K	L	-	-	-	K	A	L	V	-	-	V	S

"-" quiere decir que el resto no sufrió cambios a partir de la secuencia de la estructura receptora IGHV1-24

Evaluación de variantes de VL humanizadas en un ELISA de unión de β -amiloide

Se evaluaron variantes de L0 y V_L humanizadas expresadas a pequeña escala en cultivos de 6 pocillos para determinar su unión al péptido A β (1-40) humano. Todas las variantes se analizaron combinadas con H11. La Tabla 10 resume todas las variantes de V_L funcionales generadas.

Tabla 10 Variantes de V_L humanizadas seleccionadas

Variante de VL humanizada	Numeración según Kabat	8	11	43	63	64	100	104
	6F6	A	N	P	T	S	G	L
	IGKV-2-28	P	L	S	S	G	Q	V
L0		-	-	-	-	-	-	-
L2		-	-	-	-	S	-	-
L3		-	-	P	-	-	-	-

(continuación)

Variante de VL humanizada	Numeración según Kabat	8	11	43	63	64	100	104
	6F6	A	N	P	T	S	G	L
	IGKV-2-28	P	L	S	S	G	Q	V
L4		-	-	-	T	-	-	-
L5		-	-	-	-	-	G	L
L6		-	-	P	T	-	G	L
L7		-	-	P	-	S	-	-
L8		-	-	P	T	-	-	-
L9		-	N	-	-	S	-	-
L10		A	-	-	-	S	-	-
L11		-	-	-	-	S	G	-
L12		-	N	P	-	-	-	-
L13		A	-	P	-	-	-	-
L14		-	-	P	-	-	G	-

Las mejores combinaciones de V_H de las variantes de cadenas pesadas H11 con las cadenas ligeras L2 y L9, L10, L12 y L13 se examinaron con más cuidado. Para estos experimentos se usó material de anticuerpo purificado generado en células CHO en suspensión. Los resultados de dos experimentos independientes con dos concentraciones de recubrimiento diferentes del péptido A β (1-40) se muestran más adelante en la Tabla 11.

Tabla 11 Valores de CE50 para la unión de las variantes humanizadas al péptido A β (1-40)

	0,1 $\mu\text{g/ml}$ A β 1-40 Exp 1	0,5 $\mu\text{g/ml}$ A β 1-40 Exp 1	0,1 $\mu\text{g/ml}$ A β 1-40 Exp 2	0,1 $\mu\text{g/ml}$ A β 1-40 Exp 3
6F6c	0,085 (pred) $\pm$ 0,009	0,06 $\pm$ 0,003	0,043 $\pm$ 0,002	0,048 $\pm$ 0,003
H11L2	0,205 $\pm$ 0,008	0,119 $\pm$ 0,005	0,102 $\pm$ 0,004	0,068 $\pm$ 0,004
H11L9	0,09 $\pm$ 0,009	0,061 $\pm$ 0,002	0,051 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,002
H11L10	0,148 $\pm$ 0,004	0,071 $\pm$ 0,002	0,054 $\pm$ 0,002	0,056 $\pm$ 0,001
H11L12	0,189 $\pm$ 0,011	0,06 $\pm$ 0,003	0,055 $\pm$ 0,003	0,058 $\pm$ 0,002
H11L13	0,224 $\pm$ 0,008	0,064 $\pm$ 0,002	0,056 $\pm$ 0,002	0,061 $\pm$ 0,002

Las concentraciones se refiere al péptido A β que se usó para recubrir las placas de microtitulación; los valores que se muestran son de pocillos duplicados y se muestra el ET para cada par.

ELISA competitivo para determinar la unión a β -amiloide 1-40 humano en solución

Se evaluaron 6F6c y los anticuerpos humanizados H11L2, H11L9, H11L10, H11L12 y H11L13 para determinar su capacidad de unirse al péptido A β 1-40 en solución e inhibir la interacción del péptido A β 1-40 humano con anticuerpo monoclonal de ratón 6F6 en un ELISA competitivo. Se preincubó una concentración constante de β -amiloide 1-40 biotinilado con cantidades diluidas en serie de variantes humanizadas del anticuerpo 6F6. Después se añadió la mezcla que incluye amiloide en complejos y libre a los pocillos que contenían anticuerpo monoclonal de ratón 6F6 inmovilizado y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y después se detectó la cantidad de β -amiloide libre que todavía estaba disponible para unirse al anticuerpo monoclonal 6F6 progenitor inmovilizado usando conjugado de estreptavidina-HRP.

La Tabla 12 muestra los valores de CI50 de esta competición para dos experimentos independientes usando material de anticuerpo purificado. Todas las variantes humanizadas fueron capaces de competir eficazmente para unirse al anticuerpo monoclonal 6F6 progenitor con valores de CI50 muy similares.

Tabla 12: Valores de CI50 para la competición de variantes humanizadas en su unión a β -amiloide 1-40 humano con anticuerpo monoclonal 6F6 mediante ELISA

Variante humanizada	Exp 1		Exp 2	
	CI50 $\mu\text{g/ml}$	Error típico	CI50 $\mu\text{g/ml}$	Error típico
6F6c	0,566	0,027	0,451	$\pm 0,013$
H11L2	0,862	0,024	0,578	$\pm 0,024$
H11L9	0,588	0,018	0,518	$\pm 0,028$
H11L10	0,622	0,041	0,519	$\pm 0,016$
H11L12	0,561	0,025	0,549	$\pm 0,018$
H11L13	0,616	0,015	0,531	$\pm 0,023$

Cinética de la unión de variantes humanizadas determinada mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial

Se determinó la afinidad de las combinaciones de cadenas pesadas y ligeras usando un aparato Biacore T100. Se realizaron tres experimentos independientes usando anticuerpo humanizado inmovilizado mediante chips Biacore con superficie de proteína A e inyección de péptidos β -amiloide 1-40. La molécula quimérica de 6F6 sirvió de molécula de referencia. Para esto se inmovilizó Proteína A sobre un chip CM5 mediante acoplamiento de amina primaria de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se capturaron anticuerpos contra β -amiloide sobre esta superficie y después de un periodo de estabilización se hizo pasar β -amiloide 1-40 humano a concentraciones de 256-2 nM en diluciones a la mitad. Se usó una inyección de tampón sobre la superficie del anticuerpo capturado como doble referencia del conjunto de datos de acuerdo con la mejor práctica Biacore. Las condiciones de regeneración ligeramente ácidas elegidas eliminaron el anticuerpo pero no afectaron significativamente la capacidad de la superficie de Proteína A de realizar otro evento de captura. El trabajo se realizó en HBS-EP a 25 °C. Los resultados se resumen en la Tabla 13 en términos de la media de los tres experimentos.

Tabla 13 Datos de afinidad y cinética para variantes de anticuerpo humanizado purificadas seleccionadas

Construcción de anticuerpo	KD media [nM]	ET
6F6c	3,74	1,20
H11L2	9,57	2,31
H11L9	4,91	1,25
H11L10	5,57	1,66
H11L12	6,95	2,34
H11L13	7,41	2,39
Los datos muestran la KD media y el ET de tres experimentos independientes		

Mapeo detallado de los epítomos del anticuerpo humanizado H11L9

Se realizó un mapeo detallado del epítipo de unión mínimo del anticuerpo humanizado monoclonal H11L9 usando el lector de placas SRU BIND (SRU Biosystems). Se generaron tres conjuntos de péptidos, basándose en una secuencia de 18 aminoácidos para el mapeo detallado del epítipo: a) un conjunto de péptidos barridos con alanina para el que 10 de los restos 27-37 se sustituyeron consecutivamente con un resto alanina; b) un conjunto de péptidos truncados en el extremo N en el que se eliminaba sucesivamente un resto del extremo N del péptido 18-mero empezando a partir del resto 23 y c) un conjunto de péptidos truncados en el extremo C en el que se eliminaba

sucesivamente un resto del extremo C del péptido 18-mero empezando a partir del resto 40.

Todos los péptidos se generaron en el siguiente formato; Biotina-enlazador de SGSG-PÉPTIDO-amida, el enlazador se alargaba cuando era necesario para asegurar que todos los péptidos eran 22-meros.

Se lavó una placa biosensora recubierta con estreptavidina (SRU Biosystems) con PBS y se centrifugó boca abajo para eliminar el tampón y después se lavó con PBS, 0,1 % de tween20 y 0,4 % de acetonitrilo y se centrifugó boca abajo para eliminar el tampón residual. Los pocillos se volvieron a suspender en 100 µl de PBS, 0,1 % de tween20 y 0,4 % de acetonitrilo y se leyeron en el lector de placas SRU para establecer los valores iniciales. Después se eliminaron 50 µl del tampón y se añadieron 50 µl de péptido diluido y se dejó que se unieran. La placa después se lavó con PBS dos veces y después se volvió a suspender en 100 µl de PBS y se volvieron a medir los valores iniciales. Una vez se hubieron establecido los valores iniciales, se eliminaron 50 µl de tampón y se añadió H11L9 y un anticuerpo de control a una concentración final de 30 µg/ml. Se controló la unión de los anticuerpos. Las placas se lavaron dos veces con PBS y se volvieron a suspender en 100 µl de PBS, y las placas se volvieron a medir y se referenciaron de nuevo a la adición de anticuerpo para buscar moléculas con enlace débil que pudieran eliminarse mediante la etapa de lavado. Se tomaron los niveles de unión de la placa lavada y se analizaron para determinar la unión de los anticuerpos al conjunto de diversos péptidos.

La delección en el extremo N de la región no mostró efectos sobre la unión cuando se eliminaron los restos D23 a N27 de forma secuencial. La delección de K28 provocó una reducción de la unión en más del 50 % pero la delección de los restos G29 a A30 no redujo más la unión. La delección del resto 131 y más allá suprimió totalmente la unión. Esto definió la frontera del extremo N que requería K28 para la unión completa. La delección en el extremo C de la región no mostró efectos sobre la unión cuando se eliminaron los restos V40 a L34 de uno en uno. Sin embargo, la unión se suprimió completamente al eliminar la posición G33 y más allá. Esto definió la frontera del extremo C que requería al menos el resto G33 para la unión. Por lo tanto, los datos de la delección en los extremos N y C tomados junto mapearon de forma detallada H11L9 al epítipo mínimo KGAIIG, restos 28-33, en el péptido β-amiloide. Esto confirma el mapeo de péptidos superpuestos anterior de los epítipos con anticuerpo monoclonal 6F6 pero la eliminación del resto M35 pareció provocar un descenso en la señal de unión con 6F6.

El barrido de sustitución con alanina de los restos N27 a G37 mostró que la sustitución de los aminoácidos I32 y en particular G33 con alanina tenía el mayor impacto sobre la unión. Estos datos también confirmaron los datos de delección del extremo C anteriores en los que G33 parecía ser crucial para la unión de este anticuerpo. Los resultados se resumen en la Tabla 14 en forma esquemática.

Tabla 14 Resumen esquemático del mapeo detallado de los epítipos para H11L9

Nº de residuo en beta amiloide	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Aminoácido	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V
Barrido con alaninas																		
Truncado en el extremo N >																		
Truncado en el extremo C >																		

	Resto no investigado en el conjunto de péptidos
	Ningún impacto sobre la unión (similar a de un 18-mero completo)
	Unión reducida
	La eliminación del resto provoca pérdida de la unión
	No fue posible evaluar

Desinmunización del anticuerpo humanizado H11L9

Se realizó una evaluación *in vitro* de los potenciales epítipos en células Th y se sustituyeron restos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de los dominios de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable (SEC ID N°: 24 y SEC ID N°: 26 respectivamente) por restos alternativos para destruir estos epítipos a la vez que se mantenía la funcionalidad. Las posiciones 23, 30, 31, 38, 42, 61 y 95 para Vh y los restos 11, 30, 52 y 53 para VL se sustituyeron con los aminoácidos alternativos que se muestran en las Tablas 15 y 16 para cada posición.

Tabla 15 Sustituciones de aminoácidos seleccionadas en H11 de Vh humanizada

Variante humanizada de Vh	Numeración según Kabat	23	30	31	38	42	61	95
	H11	K	K	V	R	G	P	S
H36		T	-	-	-	-	-	-
H37		-	H	-	-	-	-	-
H38		-	-	T	-	-	-	-
H39		-	-	-	Q	-	-	-
H40		-	-	-	-	E	-	-
H41		-	-	-	-	-	Q	-
H42		-	-	-	-	-	-	R
H43		T	H	T	Q	E	Q	R
H44		T	H	T	Q	E	Q	-
H45		-	H	T	-	-	-	-
H46		T	H	-	-	-	-	-
H47		T	-	-	-	E	-	-
H48		-	H	-	-	E	-	-
H49		-	-	T	-	E	-	-
H50		T	H	-	-	E	-	-
H51		-	H	T	-	E	-	-

Tabla 16 Sustituciones de aminoácidos seleccionadas en L9 de VL humanizada

Variante de VL humanizada	Numeración según Kabat	11	30	52	53
	L9	N	I	S	N

L15		-	K	-	-
L16		-	-	D	-
L17		-	-	-	H
L18		L	K	D	H
L19		-	K	D	H
L20		-	-	D	H
L21		-	K	D	-
L22		-	K	-	H

Las regiones V se sintetizaron mediante construcción con oligos superpuestos y amplificación por PCR tal como se describe anteriormente o mediante mutagénesis dirigida al sitio usando las variantes H11 y L9 de cadena pesada y ligera como plantillas. Se incluyeron los sitios de restricción para la clonación en los vectores de expresión de mamífero RLD-bshe y RLN-bshe y una secuencia de señal murina (Kabat y col. "Sequences of Immunological Interest", NIH, 1991, Quinta edición, p3.0 95VNP'CL). Los productos que que codificaban las regiones V modificadas se clonaron después en los vectores de expresión de mamífero: se clonaron variantes de cadena pesada en RLD-bshe con el promotor pEF para generar ADN que codificaba cadenas pesadas mutadas de Fc de IgG1 humana de longitud completa; se clonaron variantes de cadena ligera en marco en el ADN que contenía RLN-bshe con el promotor pEF que codificaba la región constante kappa humana generando ADN que codificaba cadenas ligeras kappa humanas de longitud completa.

Inicialmente, se expresaron variantes nuevas de Vh H36-H44 y se evaluaron combinadas con la cadena ligera L9 y se expresaron y evaluaron nuevas variantes de VL L15-L18 combinadas con la cadena pesada H11. Los anticuerpos expresados se analizaron para determinar su unión a beta amiloide 1-40 sintético usando el sobrenadante de cultivo de expresión y análisis por ELISA y Biacore. Después de esta evaluación, se combinaron los cambios únicos que mejor mantenían la potencia de unión generando construcciones de cadenas pesada y ligera H45-H51 y L19-L22. Estas nuevas variantes de las cadenas se expresaron de nuevo combinadas con las cadenas emparejadas H11 y L9 tal como se describe anteriormente. Para este segundo conjunto de variantes, se combinaron las mejores cadenas pesadas (H48-H51) o ligeras (L19-L21) entre sí para generar un tercer conjunto que de nuevo se expresó e investigó mediante Biacore para determinar la cinética de la unión a beta amiloide 1-40. La Tabla 17 muestra esas combinaciones y la cinética de unión

Tabla 17: Conjunto seleccionado de construcciones desimmunizadas humanizadas y cinética de unión (Biacore)

Construcciones	ka	kd	KD (nM)
H48L19	1,474E+5	4,643E-4	3,15
H49L19	1,549E+5	4,780E-4	3,09
H50L19	1,333E+5	3,682E-4	2,76
H51L19	1,405E+5	3,717E-4	2,65
H48L20	1,024E+5	2,065E-4	2,02
H49L20	9,967E+4	2,223E-4	2,23
H50L20	8,486E+4	2,122E-4	2,50
H51L20	9,646E+4	2,149E-4	2,23
H48L21	1,453E+5	2,922E-4	2,01
H49L21	1,405E+5	3,621E-4	2,58
H50L21	1,232E+5	2,671E-4	2,17
H51L21	1,383E+5	2,840E-4	2,05
H11L9 (sup)	1,019E+5	2,517E-4	2,47
H11L9 (pur)	1,013E+5	2,490E-4	2,46
Quimera 6F6 (pur)	1,815E+5	1,809E-4	1,00

Procedimiento Biacore que se usó para determinar la cinética de unión

El anticuerpo contra IgG humana (Biacore BR-1008-39) se acopló sobre un chip biosensor CM5 mediante acoplamiento de amina primaria. Los anticuerpos contra beta amiloide se capturaron sobre esta superficie. Después se hizo pasar beta amiloide (1-40) a 256, 64, 16, 4 y 1 nM, usando 0 nM (es decir, se hizo pasar tampón solo sobre la superficie del anticuerpo capturado) como referencia doble. Entre cada inyección de amiloide, la superficie se regeneró usando MgCl_2 3 M, esto eliminó el anticuerpo capturado pero no afectó significativamente a la capacidad de la superficie contra la proteína humana de capturar anticuerpos en análisis posteriores. Los datos se analizaron

usando el modelo 1:1 inherente a la T100. El experimento se realizó a 25 °C y 37 °C usando HBS-EP como tampón para el experimento.

A partir de este conjunto, se evaluaron también algunas construcciones para determinar la cinética de su unión a temperatura fisiológica. La Tabla 18 muestra la cinética de unión de un subconjunto de estas construcciones a 37 °C.

Tabla 18: Subconjunto seleccionado de construcciones de la Tabla 17 evaluadas para determinar la cinética de unión a 37 °C (Biacore)

Construcción	ka	kd	KD (nM)
H48L20	3,080E+5	1,091E-3	3,54
H50L20	2,704E+5	9,466E-4	3,50
H51L20	2,670E+5	1,037E-3	3,89
H48L21	3,776E+5	1,017E-3	2,69
H50L21	3,503E+5	9,463E-4	2,70
H51L21	3,384E+5	9,817E-4	2,90
H48L17	2,839E+5	1,340E-3	4,72
H49L17	3,439E+5	1,448E-3	4,21
H11L9 (sup)	2,970E+5	8,592E-4	2,89
H11L9 (pu)	3,261E+5	1,015E-3	3,11

Secuencias de aminoácidos de las regiones V de las estructuras receptoras y variantes humanizadas

10 Región V de la estructura receptora de la cadena pesada de IGVH1-24, secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 13)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHVVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTS
TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT

ADN de la región V de la estructura receptora de la cadena pesada de IGVH1-24 (SEC ID N°: 14)

15 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTT
CCGGATACACCCTCACTGAATTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGG
AGGTTTTGATCCTGAAGATGGTGAACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACA
CATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA

20 Secuencia de aminoácidos de la región V de la estructura receptora de la cadena ligera de IGKV2-28 (SEC ID N°: 16)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCMQALQTP

ADN de la región V de la estructura receptora de la cadena ligera de IGKV2-28 (SEC ID N°: 17)

25 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC
TAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC
AGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACA
GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACT
CCT

Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada humanizada de H11 (SEC ID N°: 23)

30 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGGAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTT
CCGGATTCAACATTAAGGTCTACTATGTGCACTGGCTGCGACAGCTTCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATCGGA

AGGATTGATCCTGAAAATGGTGAAGTATATATACCCCGAAATTCAGGACAAGGCCACCTTGACCGTAGACACA
TCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGTTAGTTC
GGGCTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de la región variante V de la cadena pesada humanizada de H11 (SEC ID N°: 24)

5 QVQLVQSGAEVKEPGASVKVCKGSGFNIKVVYVHWRQLPGKLEWIGRIDPENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDT
AYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena ligera humanizada de L9 (SEC ID N°: 25)

10 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCAATCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC
TAGCAAGAGTCTCCTACATAGGAATGGCATCACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACA
GCTCCTGATCTATCAGATGTCCAACCTTGCTCAGGGGTCCCTGACAGGTTCACTAGCAGTGGATCAGGCACAG
ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCGCTCAAAATCTAGAACTTT
GGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de la región variante V de la cadena ligera humanizada de L9 (SEC ID N°: 26)

15 DIVMTQSPLSNPVTGPGEPAISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de H11 maduro (SEC ID N°: 27)

20 QVQLVQSGAEVKEPGASVKVCKGSGFNIKVVYVHWRQLPGKLEWIGRIDPENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDT
AYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGA
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de L9 maduro (SEC ID N°: 28)

25 DIVMTQSPLSNPVTGPGEPAISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADN de la cadena pesada de H11 optimizado (SEC ID N°: 29)

30 CAGGTGCAGCTCGTGAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGG
CAGCGGCTTCAACATCAAAGTGTACTACGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCGGAAAGGGCCTGGAGTGGATT
GGCAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCAAGTTCAGGACAAGGCCACCTGACCGTG
GACACGACACCCGACACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTCGG
TGAGCAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT
TCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACT
TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGGGGTGCACACCTTCCCCGCCGTGC
35 TGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAA
GACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCTGAACTGGCCGGAGCCCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAGAG
CCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGAC
CCTGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAA
40 CAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAAT
ACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC
CAGGGAACCCAGGTGTACACCTGCCCCCTCCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT
CTGGTGAAGGGCTTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGCCGAGAACAACTACA
AGACCACCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCG
45 GTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGTGACAGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC
CTGAGCCTGTCCCCGGCAAG

ADN de la cadena ligera de L9 optimizado (SEC ID N°: 30)

50 GACATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCAATCCCGTGAAGTCCCGGCGAGCCCGCCTCAATCAGCTGCAGGA
GCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGGAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC
CCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACCTGGCCAGCGGCGTCCCGACCGGTTCTCTAGCAGCGGAAGCGGC
ACCGACTTCAACCTGAAGATCAGCAGGGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCAGAACCTGG
AGCTCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCCGCCCGAGCGTGTTCATCTT
CCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCGG
GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAG

GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGG
TGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena pesada de H48 (SEC ID N°: 59)

5 QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKGSGFNIHVYVHWRQLPEKLEWIGRIDPENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDT
AYMELSSLRSEDTAVYYCVSSGYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada de H48 (SEC ID N°: 60)

10 CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGG
CAGCGGCTTCAACATCCACGTGTACTACGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGATT
GGCAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCCAAGTTCCAGGACAAGGCCACCCTGACCGTG
GACACCAGCACCGACACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCG
TGAGCAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena pesada de H49 (SEC ID N°: 61)

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKGSGFNIKTYVHWRQLPEKLEWIGRIDPENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDT
AYMELSSLRSEDTAVYYCVSSGYWGQGLTVTVSS

15 **Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada de H49 (SEC ID N°: 62)**

20 CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGG
CAGCGGCTTCAACATCAAACTACTACGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGATT
GGCAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCCAAGTTCCAGGACAAGGCCACCCTGACCGTG
GACACCAGCACCGACACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCG
TGAGCAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena pesada de H50 (SEC ID N°: 63)

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKTSGSFNIHVYVHWRQLPEKLEWIGRIDPENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDT
AYMELSSLRSEDTAVYYCVSSGYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada de H50 (SEC ID N°: 64)

25 CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCACCGG
CAGCGGCTTCAACATCCACGTGTACTACGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGATT
GGCAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCCAAGTTCCAGGACAAGGCCACCCTGACCGTG
GACACCAGCACCGACACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCG
TGAGCAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

30 **Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena pesada de H51 (SEC ID N°: 65)**

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKGSGFNIHTYVHWRQLPEKLEWIGRIDPENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDT
AYMELSSLRSEDTAVYYCVSSGYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada de H51 (SEC ID N°: 66)

35 CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGG
CAGCGGCTTCAACATCCACACTACTACGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGATT
GGCAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCCAAGTTCCAGGACAAGGCCACCCTGACCGTG
GACACCAGCACCGACACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCG
TGAGCAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena ligera de L19 (SEC ID N°: 67)

40 DIVMTQSPLSNPVTGPASPISCRSSKSLHRNGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMDHLASGVPDRFSSSSSGTDFTL
KISRVEAEDVGYYCAQNLELWTFGQGTKVEIK

Secuencia de ADN de la región variante de la cadena ligera de L19 (SEC ID N°: 68)

45 GACATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCAATCCCGTGACTCCCGGCGAGCCCGCCTCAATCAGCTGCAGGA
GCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGGAACGGCAAGACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC
CCAGCTGCTGATCTACCAGATGGACCACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCTAGCAGCGGAAGCGG
CACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGACTACTGCGCCCAAGACCTG
GAGCTCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAA

Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena ligera de L20 (SEC ID N°: 69)

DIVMTQSPLSNPVTPGEPASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMDHLASGVPDRFSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQGTKVEIK

Secuencia de ADN de la región variante de la cadena ligera de L20 (SEC ID N°: 70)

5 GACATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCAATCCCGTGACTCCCGGCGAGCCCGCCTCAATCAGCTGCAGGA
GCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGGAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC
CCAGCTGCTGATCTACCAGATGGACCACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCTAGCAGCGGAAGCGG
CACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTAATACTGCGCCCAGAACCTG
GAGCTCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAA

Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena ligera de L21 (SEC ID N°: 71)

10 DIVMTQSPLSNPVTPGEPASISCRSSKSLHRNGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMDNLSGVPDRFSSSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQGTKVEIK

Secuencia de ADN de la región variante de la cadena ligera de L21 (SEC ID N°: 72)

15 GACATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCAATCCCGTGACTCCCGGCGAGCCCGCCTCAATCAGCTGCAGGA
GCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGGAACGGCAAGACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC
CCAGCTGCTGATCTACCAGATGGACAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCTAGCAGCGGAAGCGG
CACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTAATACTGCGCCCAGAACCTG
GAGCTCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAA

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia definida en la SEC ID N°: 65 y un dominio V_L que tiene la secuencia definida en la SEC ID N°: 71.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Una composición farmacéutica que comprende un activcuerpo tal como se define en la reivindicación 1 y un inhibidor de la vía de complemento o un activador de la vía de complemento.
4. Un anticuerpo terapéutico tal como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con péptido β-amiloide.
- 10 5. Uso de un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con péptido β-amiloide.
6. Un anticuerpo para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 4 o un uso tal como se reivindica en la reivindicación 5, en los que la enfermedad relacionada con péptido β-amiloide es enfermedad de Alzheimer, degeneración macular senil (AMD), glaucoma o formación de cataratas dependiente de β-amiloide.
- 15 7. Un anticuerpo para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 4 o un uso tal como se reivindica en la reivindicación 5, en los que el anticuerpo es administrado en combinación con un inhibidor de la vía de complemento o un inhibidor de un activador de la vía de complemento.
8. Un anticuerpo para su uso o el uso tal como se reivindica en la reivindicación 7 o una composición farmacéutica tal como se reivindica en la reivindicación 3, en los que el inhibidor de la vía de complemento es un factor de complemento H, (CFH) o un receptor de complemento 1 soluble, (sCR1).
- 20 9. Un anticuerpo para su uso o el uso tal como se reivindica en la reivindicación 7 o una composición farmacéutica tal como se reivindica en la reivindicación 3, en los que el inhibidor de un activador de la vía de complemento es un factor de complemento D, (CFD).
10. Un procedimiento de producción de un anticuerpo tal como se reivindica en la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento la expresión de un polinucleótido que codifica el anticuerpo en una célula huésped.
- 25

Figura 1

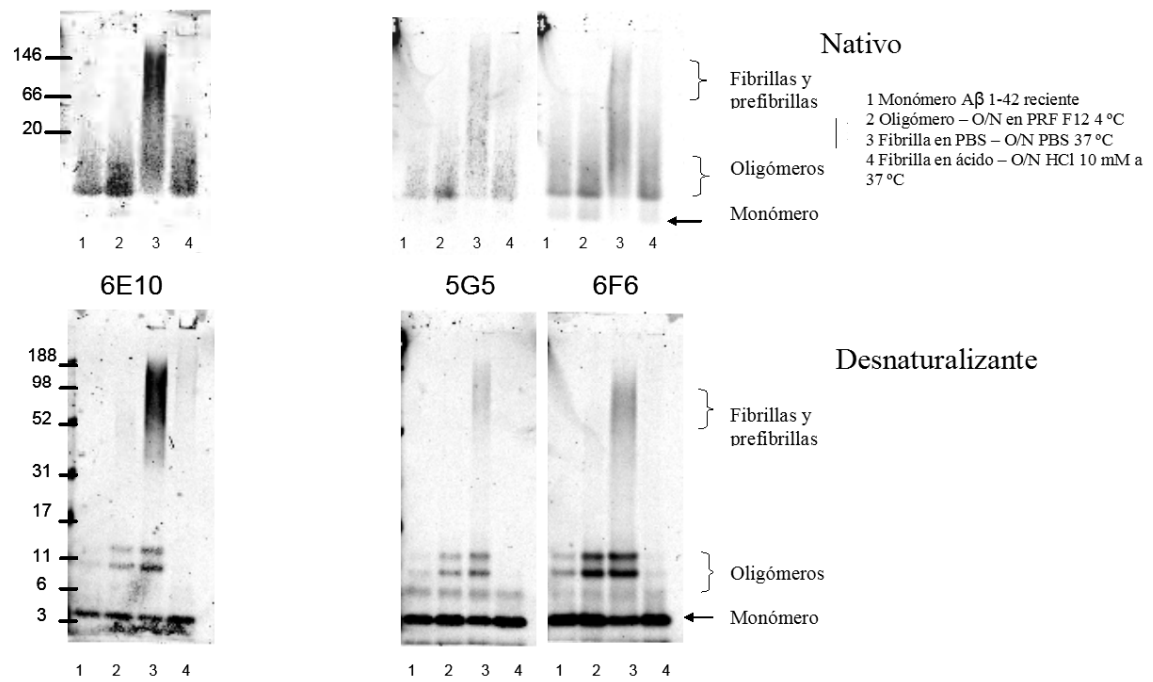


Figura 2

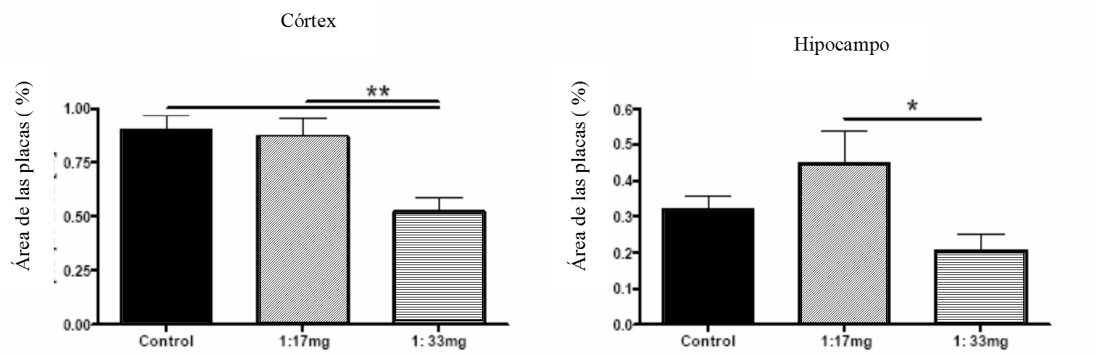


Figura 3

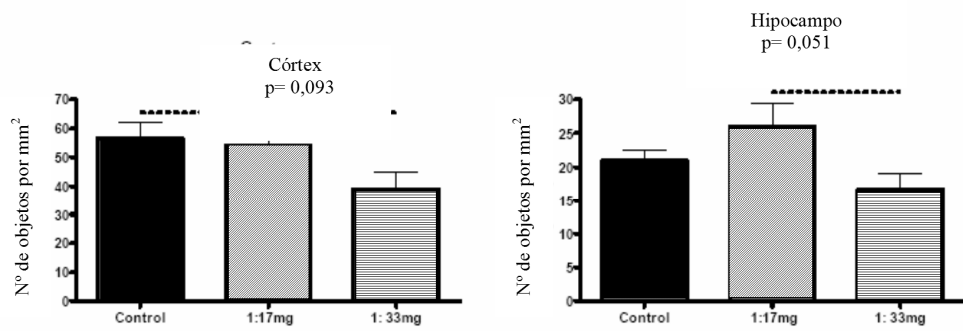


Figura 4

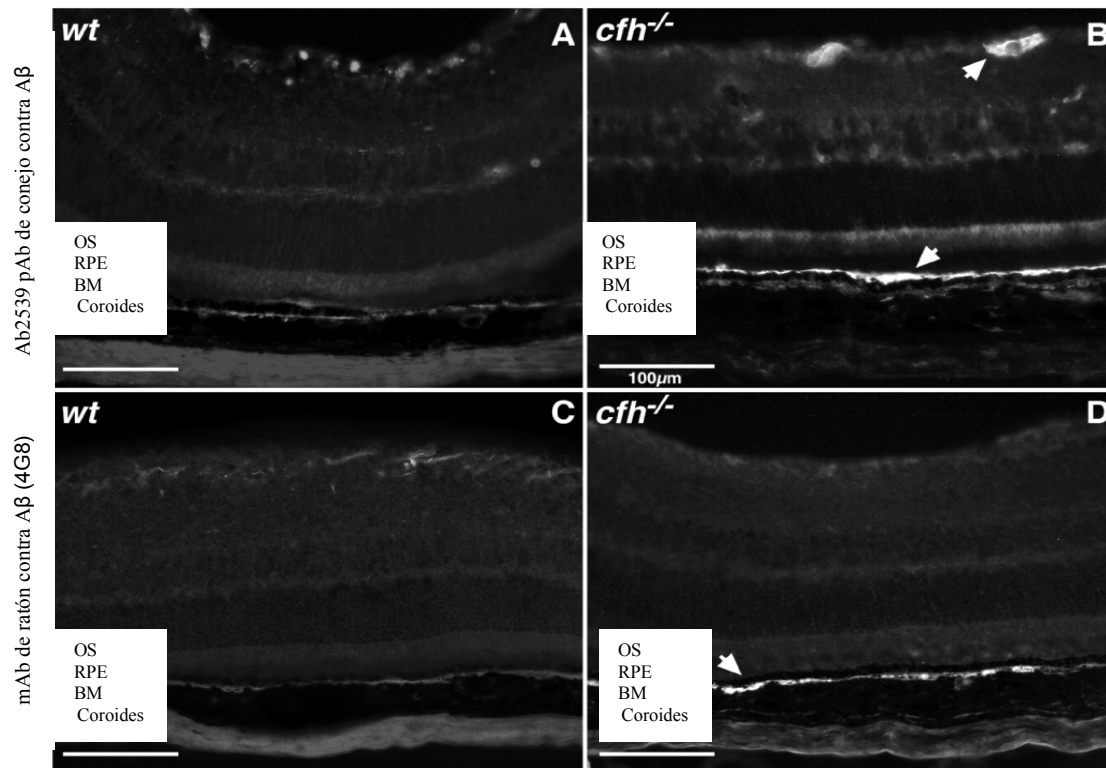


Figura 5

