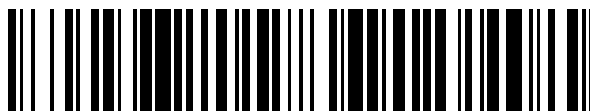


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 661**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2006 E 10178394 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2289909**

54 Título: **Método de exploración, proceso para purificar oligómeros A $\beta$  no difundibles, anticuerpos selectivos contra dichos oligómeros A $\beta$  no difundibles y un proceso para fabricar dichos anticuerpos**

30 Prioridad:

**30.11.2005 US 740866 P**

**03.03.2006 US 779171 P**

**30.03.2006 US 787361 P**

**05.09.2006 US 842400 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.01.2015**

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (50.0%)**  
**1 North Waukegan Road**  
**North Chicago, IL 60064, US y**  
**ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARGHORN, STEFAN;**  
**EBERT, ULRICH;**  
**HILLEN, HEINZ;**  
**KELLER, PATRICK;**  
**STRIEBINGER, ANDREAS y**  
**LABKOVSKY, BORIS**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 527 661 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de exploración, proceso para purificar oligómeros A $\beta$  no difundibles, anticuerpos selectivos contra dichos oligómeros A $\beta$  no difundibles y un proceso para fabricar dichos anticuerpos

5 La presente invención se relaciona con anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ , porciones de unión a antígeno de estos, hibridomas que producen dichos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, células huésped que comprenden dichos vectores, métodos para producir dichos anticuerpos, composiciones que comprenden dichos anticuerpos, usos de dichos anticuerpos en terapia y diagnóstico, y métodos correspondientes, relacionados con la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

15 En 1907, el médico Alois Alzheimer describió por primera vez las características neuropatológicas de una forma de demencia nombrada posteriormente en su honor (Alzheimer 1907). La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa de demencia más frecuente entre las personas de edad, con una incidencia de aproximadamente 10 % entre la población con una edad superior a 65 años. Al aumentar la edad, también aumenta la probabilidad de contraer la enfermedad. En el mundo hay aproximadamente 15 millones de personas afectadas, y se espera que los incrementos adicionales en la expectativa de vida aumenten la cantidad de personas enfermas hasta aproximadamente el triple durante las siguientes décadas.

20 Desde un punto de vista molecular, la enfermedad de Alzheimer (AD) se caracteriza por el depósito de proteínas agregadas de forma anormal. En el caso de las placas amiloides extracelulares, estos depósitos consisten principalmente en filamentos de péptidos  $\beta$  amiloides, en el caso de las redes neurofibrilares intracelulares (NFT) de la proteína tau. El péptido  $\beta$  amiloide (A $\beta$ ) surge de la proteína precursora  $\beta$ -amiloide merced a un corte proteolítico. Este corte es efectuado por la actividad cooperativa de varias proteasas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa. El corte resulta en una cantidad de fragmentos específicos con distintas longitudes. Las placas amiloides consisten principalmente en péptidos con una longitud de 40 o 42 aminoácidos (A $\beta$ 40, A $\beta$ 42). El producto de corte dominante es A $\beta$ 40; sin embargo, A $\beta$ 42 tiene un efecto tóxico mucho más fuerte.

30 Los depósitos amiloides cerebrales y las alteraciones cognitivas muy similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer también son característicos del síndrome de Down (trisomía 21), que ocurre con una frecuencia de aproximadamente 1 cada 800 nacimientos.

35 La hipótesis de la cascada amiloide de Hardy y Higgins postula que la producción incrementada de A $\beta$ (1-42) resulta en la formación de protofibrillas y fibrillas, los componentes principales de las placas A $\beta$ , donde estas fibrillas son responsables de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. A pesar de la correlación baja entre la severidad de la demencia y la carga de placas A $\beta$  depositadas, esta hipótesis fue favorecida hasta hace poco tiempo. El descubrimiento de formas solubles de A $\beta$  en los cerebros con AD, que se correlacionan mejor con los síntomas de la AD que la carga de placas, ha resultado en una hipótesis revisada de la cascada amiloide.

40 La inmunización activa con péptidos A $\beta$  ha resultado en una reducción de la formación, y también en la disolución parcial de las placas existentes. Al mismo tiempo, resulta en el alivio de los defectos cognitivos en modelos de ratones transgénicos APP.

45 También se verificó una reducción de la carga de placas A $\beta$  para la inmunización pasiva con anticuerpos dirigidos a los péptidos A $\beta$ .

50 Los resultados de una prueba de fase IIa (ELAN Corporation Plc, San Francisco Sur, CA, EEUU, y Dublín, Reino Unido) de inmunización activa con AN-1792 (péptido A $\beta$ (1-42) en una condición de agregación fibrilar) sugieren que la inmunoterapia dirigida a los péptidos A $\beta$  fue exitosa. En un subgrupo de 30 pacientes, el progreso de la enfermedad se vio reducido significativamente en pacientes con una titulación positiva de anticuerpos anti-A $\beta$ , medida de acuerdo con los índices MMSE y DAD. Sin embargo, este estudio fue interrumpido debido a los efectos colaterales serios, en forma de una meningoencefalitis (Bennett y Holtzman, 2005, *Neurology*, 64, 10-12).

55 La meningoencefalitis fue caracterizada por la neuroinflamación y la infiltración de células T en el cerebro. Presumiblemente, esto se debió a una respuesta inmune mediada por células T, inducida por la inyección de A $\beta$ (1-42) como antígeno. Esta respuesta inmune no habría de esperarse después de una inmunización pasiva. Hasta la fecha, no hay datos clínicos disponibles con referencia a esto. Sin embargo, con referencia a este enfoque pasivo con respecto a la inmunización, se invocaron riesgos relacionados con el perfil de efectos colaterales, debido a estudios preclínicos en ratones APP23 muy viejos que recibieron un anticuerpo dirigido contra un epítipo N-terminal de A $\beta$ (1-42) una vez por semana durante 5 meses. Estos ratones presentaron un incremento en la cantidad y la severidad de microhemorragias en comparación con los animales control tratados con solución salina (Pfeifer *et al.*, 2002, *Science*, 298, 1379). También se describió un incremento comparable en las microhemorragias en ratones Tg2576 y PDAPP muy viejos (de más de 24 meses) (Racke *et al.*, 2005, *J Neurosci*, 25, 629-636; Wilcock *et al.*, 2004, *J. Neuroinflammation*, 1(1):24; De Mattos *et al.*, 2004, *Neurobiol. Aging* 25(S2):577). En ambas cepas de ratones, la inyección de anticuerpos resultó en un incremento significativo de las microhemorragias. En contraste, un anticuerpo dirigido contra la región central del péptido A $\beta$ (1-42) no indujo microhemorragias (de Mattos *et al.*, *supra*).

La ausencia de inducción de microhemorragias fue asociada con el tratamiento con anticuerpos que no se unieron al péptido A $\beta$  agregado en forma de CAA (Racke *et al.*, J Neurosci, 25, 629-636). Sin embargo, el mecanismo exacto que resulta en las microhemorragias en ratones transgénicos para APP aún no ha sido comprendido. Presumiblemente, la angiopatía amiloide cerebral (CAA) induce o al menos agrava las hemorragias cerebrales. La CAA está presente en casi todos los cerebros con enfermedad de Alzheimer, y aproximadamente 20 % de los casos se consideran como "CAA severa". Por consiguiente, la inmunización pasiva debería tener por objeto evitar las microhemorragias al seleccionar un anticuerpo que reconociera la región central o carboxiterminal del péptido A $\beta$ .

En el documento WO2004/06756 se describen oligómeros A $\beta$ (1-42) estables (globulómeros A $\beta$ (1-42)) y anticuerpos dirigidos específicamente contra los globulómeros. La digestión con proteasas no específicas demuestra que el globulómero A $\beta$  puede digerirse comenzando con el extremo N hidrofílico que sobresale de la estructura globular principal (Barghom *et al.*, 2005, J Neurochem, 95, 834-847). Estos globulómeros A $\beta$  con un corte N terminal (globulómeros A $\beta$ (12-42) y A $\beta$ (20-42)) representan la unidad estructural básica de este oligómero A $\beta$ . Son antígenos muy potentes para la inmunización activa de conejos y ratones que resulta en titulaciones de anticuerpos elevadas (documento WO2004/067561). La función patológica potencial de las formas de A $\beta$  con cortes N terminales *in vivo* ha sido sugerida en diversas publicaciones recientes donde se describió su existencia en cerebros con AD (Sergeant *et al.*, 2003, J Neurochem, 85, 1581-1591; Thal *et al.*, 1999, J Neuropathol. Exp Neurol, 58, 210-216). Durante la digestión *in vivo* pueden participar determinadas proteasas halladas en el cerebro, por ejemplo, la neprililina (NEP 24.11) o la enzima degradadora de insulina (IDE) (Selkoe, 2001, Neuron, 32, 177-180).

Un objeto de la presente invención fue proporcionar anticuerpos dirigidos contra globulómeros A $\beta$  que permitieran mejorar el desempeño cognitivo de un paciente sometido a inmunoterapia, y que al mismo tiempo reaccionaran solamente con una pequeña porción del péptido A $\beta$  completo en el cerebro. Se espera que esto prevenga una alteración sustancial del equilibrio de A $\beta$  en el cerebro y resulte en menos efectos colaterales (por ejemplo, se ha observado una reducción cuestionable desde el punto de vista terapéutico del volumen del cerebro en el estudio de inmunización activa con péptidos A $\beta$  en una condición de agregación fibrilar (prueba ELAN con AN1792)). Más aún, en esta prueba se observaron efectos colaterales severos en forma de meningoencefalitis.

La presente invención soluciona este problema al proporcionar anticuerpos específicos para globulómeros que poseen una afinidad elevada por formas truncadas de globulómeros A $\beta$ . Estos anticuerpos permiten discriminar no solamente otras formas de péptidos A $\beta$ , particularmente monómeros y fibrillas, sino también formas no truncadas de globulómeros A $\beta$ .

Por ende, la presente invención se relaciona con anticuerpos que comprenden una cadena pesada (VH) y ligera (VL) variable en los que los dominios CDR de cadena pesada y ligera variable comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los siguientes conjuntos de CDR:

Conjunto de CDR 1	Secuencia de Aminoácidos
VH CDR-H1	SYGVH
VH CDR-H2	VIWRGGRIDYNAAFMS
VH CDR-H3	NSDV
VL CDR-L1	KSSQSLLDIDGKTYLN
VL CDR-L2	LVSKLDS
VL CDR-L3	WQGTHFPYT
<b>Conjunto de CDR 2</b>	
VH CDR-H1	SYVMH
VH CDR-H2	YIYPYNDGTYNEKFKG
VH CDR-H3	TVEGATWDGYFDV
VL CDR-L1	KSSQSLLYSKGYTYLN
VL CDR-L2	LVSKLDS
VL CDR-L3	VQGTHFPHT
<b>Conjunto de CDR 3</b>	
VH CDR-H1	SYAMS
VH CDR-H2	SIHNRGTIFYLDSVKG
VH CDR-H3	GRSNSYAMDY
VL CDR-L1	RSTQTLVHRNGDTYLE
VL CDR-L2	KVSNRFS
VL CDR-L3	FQGSHVPYT
<b>Conjunto de CDR 4</b>	
VH CDR-H1	TFYIH
VH CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD
VH CDR-H3	AKSARAAWFAY
VL CDR-L1	RSSQSWQSNCNTYLE

VL CDR-L2	KVSNRFS
VL CDR-L3	FQGSHVPPT
<b>Conjunto de CDR 5</b>	
VH CDR-H1	TFYIH
VH CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD
VH CDR-H3	AKSARAAWFAX
VL CDR-L1	RSSQSVVQSNNGNTYLE
VL CDR-L2	KVSNRFS
VL CDR-L3	FQGSHVPPT
<b>Conjunto de CDR 6</b>	
VH CDR-H1	TFYIH
VH CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD
VH CDR-H3	AKSHRAAWFAY
VL CDR-L1	RSSQSVVQSNNGNTYLE
VL CDR-L2	KVSNRFF
VL CDR-L3	FQGSHVPPT
<b>Conjunto de CDR 7</b>	
VH CDR-H1	DYEMV
VH CDR-H2	YINSGSGTIHYADTVKG
VH CDR-H3	TLLRLHFDY
VL CDR-L1	KSSQSLFYRSRNQKNFLA
VL CDR-L2	WASTGES
VL CDR-L3	QQYFSYPWT
<b>Conjunto de CDR 8</b>	
VH CDR-H1	DYEMV
VH CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG
VH CDR-H3	TLLRLHFDY
VL CDR-L1	RSSQSLFYRSRNQKNFLA
VL CDR-L2	WASTRES
VL CDR-L3	QQYYSYPWT
<b>Conjunto de CDR 9</b>	
VH CDR-H1	DYEMV
VH CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG
VH CDR-H3	TLLRLHFDY
VL CDR-L1	RSSQSLFYRSRNQKNFLA
VL CDR-L2	WASTRES
VL CDR-L3	QQYYSYPWT
<b>Conjunto de CDR 10</b>	
VH CDR-H1	DYVIH
VH CDR-H2	YINPYNDGTQYNEKFKG
VH CDR-H3	VEGGTWDGYFDV
VL CDR-L1	Secuencia de aminoácidos de VL CDR-L1 del anticuerpo monoclonal que puede obtenerse de un hibridoma designado por el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7851
VL CDR-L2	Secuencia de aminoácidos de VL CDR-L2 del anticuerpo monoclonal que puede obtenerse de un hibridoma designado por el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7851
VL CDR-L3	Secuencia de aminoácidos de VL CDR-L3 del anticuerpo monoclonal que puede obtenerse de un hibridoma designado por el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7851

De acuerdo con una realización los anticuerpos de la presente invención tienen una afinidad de unión por un globulímero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión de este anticuerpo por un globulímero A $\beta$ (1-42).

- 5 De acuerdo con una realización adicional, los anticuerpos de la presente invención tienen una afinidad de unión por un globulímero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión de este anticuerpo por un globulímero A $\beta$ (12-42).

De acuerdo con una realización particular, la invención se relaciona por lo tanto con anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulímero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulímero A $\beta$ (1-42) y el globulímero A $\beta$ (12-42).

10

En la presente documentación, el término “A $\beta$ (X-Y)” hace referencia a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido X hasta la posición del aminoácido Y de la proteína  $\beta$  amiloide humana, incluyendo tanto X como Y, en particular, a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido X hasta la posición del aminoácido Y de la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IAT (que corresponde a las posiciones de los aminoácidos 1 a 43), o cualquiera de sus variantes de origen natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G (“Flemish”), E22G (“Arctic”), E22Q (“Dutch”), E22K (“Italian”), D23N (“Iowa”), A42T y A42V, donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo tanto la posición X como la posición Y, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 12 o X, el que sea mayor de ambos, y el aminoácido 42 o Y, el que sea menor de ambos, más preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 o X, el que sea mayor de ambos, y el aminoácido 42 o Y, el que sea menor de ambos, y más preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 o X, el que sea mayor de ambos, y el aminoácido 40 o Y, el que sea menor de ambos, donde en la presente documentación, una sustitución de aminoácido “adicional” es cualquier desviación de la secuencia canónica que no pueda hallarse en la naturaleza.

Más específicamente, el término “A $\beta$ (1-42)” hace referencia en la presente documentación a la secuencia de aminoácidos entre la posición del aminoácido 1 y la posición del aminoácido 42 de la proteína  $\beta$  amiloide humana, incluyendo 1 y 42, en particular, a la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IA, o cualquiera de sus variantes de origen natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G (“Flemish”), E22G (“Arctic”), E22Q (“Dutch”), E22K (“Italian”), D23N (“Iowa”), A42T y A42V, donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo tanto 1 como 42, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 y el aminoácido 42. Del mismo modo, el término “A $\beta$ (1-40)” hace referencia en la presente documentación a la secuencia de aminoácidos entre la posición del aminoácido 1 y la posición del aminoácido 40 de la proteína  $\beta$  amiloide humana incluyendo 1 y 40, en particular, la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW o cualquiera de sus variantes de origen natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G (“Flemish”), E22G (“Arctic”), E22Q (“Dutch”), E22K (“Italian”) y D23N (“Iowa”), donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo 1 y 40, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 y el aminoácido 40.

Más específicamente, el término “A $\beta$ (12-42)” hace referencia en la presente documentación a la secuencia de aminoácidos entre la posición del aminoácido 12 y la posición del aminoácido 42 de la proteína  $\beta$  amiloide humana, incluyendo 12 y 42, en particular, la secuencia de aminoácidos VHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IA, o cualquiera de sus variantes de origen natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A21G (“Flemish”), E22G (“Arctic”), E22Q (“Dutch”), E22K (“Italian”), D23N (“Iowa”), A42T y A42V, donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo 12 y 42, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 y el aminoácido 42.

Más específicamente, el término “A $\beta$ (20-42)” hace referencia en la presente documentación a la secuencia de aminoácidos entre la posición del aminoácido 20 y la posición del aminoácido 42 de la proteína  $\beta$  amiloide humana, incluyendo tanto 20 como 42, en particular, la secuencia de aminoácidos F AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IA, o cualquiera de sus variantes de origen natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A21G (“Flemish”), E22G (“Arctic”), E22Q (“Dutch”), E22K (“Italian”), D23N (“Iowa”), A42T y A42V, donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo tanto 20 como 42, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales.

El término “globulómero A $\beta$ (X-Y)” (oligómero globular A $\beta$ (X-Y)) hace referencia en la presente documentación a una asociación no covalente, globular y soluble de péptidos A $\beta$ (X-Y), como se los definió con anterioridad, que posee homogeneidad y características físicas distintivas. De acuerdo con un aspecto, los globulómeros A $\beta$ (X-Y) son ensamblajes oligoméricos no fibrilares estables de péptidos A $\beta$ (X-Y) que se obtienen por medio de una incubación con detergentes aniónicos. En contraste con los monómeros y las fibrillas, estos globulómeros se caracterizan por una cantidad definida de subunidades de ensamblaje (por ejemplo, formas de ensamblaje tempranas, n = 4-6, “oligómeros A”, y formas de ensamblaje tardías, n = 12-14, “oligómeros B”, como se describe en el documento WO2004/067561). Los globulómeros tienen una estructura tridimensional de tipo globular (“glóbulo fundido”, véase Barghorn *et al.*, 2005, J Neurochem, 95, 834-847). Además, pueden caracterizarse por uno o más de los siguientes parámetros:

- posibilidad de separación de los aminoácidos N-terminales X-23 debido a la acción de proteasas promiscuas (tales como termolisina o endoproteinasa GluC), lo que proporciona formas truncadas de globulómeros;
- ausencia de accesibilidad de los aminoácidos de C-terminales 24-Y a las proteasas promiscuas y los anticuerpos;
- 5 - las formas truncadas de estos globulómeros mantienen la estructura tridimensional principal de dichos globulómeros con una mejor accesibilidad del epítipo principal A $\beta$ (20-Y) en su conformación de globulómero.

De acuerdo con la invención, y en particular con el propósito de evaluar las afinidades de unión de los anticuerpos de la presente invención, el término "globulómero A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en particular en la presente documentación a un producto que se obtiene con un proceso como se describe en el documento WO 2004/067561, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Dicho proceso comprende desplegar un péptido A $\beta$ (X-Y) natural, recombinante o sintético, o un derivado de este; exponer el péptido A $\beta$ (X-Y) al menos parcialmente desplegado A $\beta$ (X-Y), o un derivado de este, a un detergente, reducir la acción del detergente; y continuar la incubación.

Con el objeto de desplegar el péptido, pueden aplicarse agentes que rompen enlaces hidrógeno, tales como, por ejemplo, hexafluoroisopropanol (HFIP), sobre la proteína. Son suficientes períodos de acción de unos pocos minutos, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y 60 minutos, cuando la temperatura de la acción es de entre 20 y 50 °C, y en particular entre aproximadamente 35 y 40 °C. La disolución subsiguiente del resto evaporado hasta la sequedad, preferiblemente en una forma concentrada, en solventes orgánicos miscibles con tampones acuosos, tales como, por ejemplo, dimetil sulfóxido (DMSO), resulta en una suspensión del péptido desplegado al menos parcialmente, o el derivado de este, que puede usarse posteriormente. De ser necesario, la suspensión madre puede almacenarse a baja temperatura, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C, por un período intermedio.

Como alternativa, el péptido, o el derivado de este, puede tomarse en una solución ligeramente ácida, preferiblemente acuosa, por ejemplo, en una solución de HCl aproximadamente 10 mM. Después de un período de incubación que comúnmente es de unos pocos minutos, los componentes insolubles se eliminan por centrifugación. Unos pocos minutos a 10000 g sirven para cumplir dicho objetivo. Estos pasos del método preferiblemente se llevan a cabo a temperatura ambiente, es decir, a una temperatura en el rango de entre 20 y 30 °C. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene el péptido A $\beta$ (X-Y), o el derivado de este, y puede almacenarse a baja temperatura, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C, por un período intermedio.

La exposición posterior a un detergente tiene por objeto la oligomerización del péptido, o el derivado de este, para obtener un tipo intermedio de oligómeros (denominados oligómeros A en el documento WO 2004/067561). Con este fin, se aplica un detergente sobre el péptido desplegado al menos parcialmente, o el derivado de este, hasta que se ha producido suficiente oligómero intermedio.

Se prefiere el uso de detergentes iónicos, en particular, detergentes aniónicos.

De acuerdo con una realización particular, se usa un detergente de fórmula (I):

R-X,

en la que el radical R es un alquilo no ramificado o ramificado que tiene entre 6 y 20, y preferiblemente entre 10 y 14 átomos de carbono, o un alquenilo ramificado o no ramificado que tiene entre 6 y 20, y preferiblemente entre 10 y 14 átomos de carbono, el radical X es un grupo ácido, o una sal de este, donde X preferiblemente se selecciona entre -COO<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, y especialmente -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, y M<sup>+</sup> es un catión hidrógeno o un catión inorgánico u orgánico seleccionado preferiblemente entre cationes de metales alcalinos y metales alcalinotérreos, y cationes de amonio.

Resultan ventajosos los detergentes de fórmula (I) en los que R es un alquilo no ramificado, de los cuales ha de hacerse la mención particular de los radicales alqu-1-ilo. En particular, se prefiere el dodecil sulfato de sodio (SDS). También puede usarse ventajosamente ácido láurico y ácido oleico. La sal de sodio del detergente laurilsarcosina (también conocido como sarcosil NL-30 o Gardol<sup>®</sup>) también es particularmente ventajosa.

El período de acción del detergente depende en particular de si el péptido sometido a la oligomerización, o el derivado de este, se ha desplegado o no, y en el primer caso, en qué medida. Si, de acuerdo con el paso de despliegue, el péptido o el derivado de este ha sido tratado con antelación con un agente para romper enlaces hidrógeno, es decir, en particular, con hexafluoroisopropanol, son suficientes períodos de acción en el rango de unas pocas horas, ventajosamente entre aproximadamente 1 y 20, y en particular entre aproximadamente 2 y 10 horas, cuando la temperatura de la acción es de entre aproximadamente 20 y 50 °C, y en particular entre aproximadamente 35 y 40 °C. Si como punto inicial se usa un péptido menos desplegado o un péptido esencialmente no desplegado, o un derivado de este, han de ser necesarios períodos de acción más prolongados. Si el péptido o el derivado de este han sido sometidos a un tratamiento previo, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento indicado con anterioridad,

como alternativa al tratamiento con HFIP, o si dicho péptido, o el derivado de este, ha sido sometido directamente a una oligomerización, son suficientes períodos de acción en el rango de entre aproximadamente 5 y 30 horas, y en particular, entre aproximadamente 10 y 20 horas, cuando la temperatura de acción es de entre aproximadamente 20 y 50 °C, y en particular, entre aproximadamente 35 y 40 °C. Después de la incubación, los componentes insolubles se eliminan ventajosamente por centrifugación. Para esto son suficientes unos pocos minutos a 10000 g.

La concentración de detergente a elegir depende del detergente usado. Si se usa SDS, resulta apropiada una concentración en el rango de entre 0,01 y 1 % en peso, preferiblemente entre 0,05 y 0,5 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 % en peso. Si se usa ácido láurico o ácido oleico, han de necesitarse concentraciones algo mayores, por ejemplo, en el rango de entre 0,05 y 2 % en peso, preferiblemente entre 0,1 y 0,5 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % en peso.

La acción del detergente debería tener lugar a una concentración de sal aproximadamente en el rango fisiológico. Por lo tanto, en particular, resultan útiles concentraciones de NaCl en el rango de entre 50 y 500 mM, preferiblemente entre 100 y 200 mM, y en particular de aproximadamente 140 mM.

La reducción subsiguiente de la acción del detergente y la continuación de la incubación tienen por objeto continuar con la oligomerización para obtener el globulómero A $\beta$ (X-Y) de la invención (conocido en el documento WO 2004/067561 como oligómero B). Como la composición obtenida en el paso precedente contiene detergente y la concentración de sal se halla en el rango fisiológico, es necesario reducir la acción del detergente, y preferiblemente, también la concentración de sal. Esto puede realizarse reduciendo la concentración del detergente y la sal, por ejemplo, por medio de una dilución, preferiblemente con agua o un tampón con una concentración de sal baja, por ejemplo, Tris-HCl, pH 7,3. Los factores de dilución en el rango de entre aproximadamente 2 y 10, ventajosamente en el rango de entre aproximadamente 3 y 8, y en particular, de aproximadamente 4, han probado ser apropiados. La reducción de la acción del detergente también puede efectuarse agregando sustancias que pueden neutralizar la acción de dicho detergente. Los ejemplos de estas sustancias incluyen sustancias capaces de formar complejos con los detergentes, tales como sustancias capaces de estabilizar las células en el transcurso de los procedimientos de purificación y extracción, por ejemplo, copolímeros de bloques EO/PO particulares, en particular, el copolímero de bloques con la marca comercial Pluronic<sup>®</sup> F 68. Del mismo modo, pueden usarse alquil fenoles alcoxilados, y en particular, etoxilados, tales como los t-octilfenoles etoxilados de la serie Triton<sup>®</sup> X, en particular, Triton<sup>®</sup> X100, 1-propansulfonato de 3-(3-colamidopropildimetilamonio) (CHAPS<sup>®</sup>), o ésteres de ácidos grasos con sorbitán alcoxilados, y en particular, etoxilados, tales como aquellos de la serie Tween<sup>®</sup>, en particular, Tween<sup>®</sup> 20, en rangos de concentración aproximadamente iguales o superiores a la concentración crítica de las micelas.

Después, la solución se incuba hasta que se ha producido una cantidad suficiente del globulómero A $\beta$ (X-Y) de la invención. Son suficientes períodos de acción en el rango de varias horas, preferiblemente en el rango de entre aproximadamente 10 y 30 horas, y en particular, en el rango de entre aproximadamente 15 y 25 horas, cuando la temperatura de la acción es de entre aproximadamente 20 y 50 °C, y en particular, entre aproximadamente 35 y 40 °C. Después, la solución puede concentrarse, y los restos posibles pueden eliminarse por centrifugación. En este caso también son útiles unos pocos minutos a 10000 g. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene un globulómero A $\beta$ (X-Y) de la invención.

Finalmente, un globulómero A $\beta$ (X-Y) de la invención puede recuperarse de una manera conocida en sí misma, por ejemplo, por ultrafiltración, diálisis, precipitación o centrifugación.

Además, es preferible si la separación por electroforesis de los globulómeros A $\beta$ (X-Y) bajo condiciones de desnaturalización, por ejemplo, por SDS-PAGE, produce una banda doble (por ejemplo, con un peso molecular aparente de 38/48 kDa para A $\beta$ (1-42)), y es especialmente preferible si al realizar el tratamiento con glutardialdehído de los globulómeros antes de la separación de estas dos bandas, dichas bandas se fusionan en una. También es preferible que la cromatografía de exclusión por tamaño de los globulómeros resulte en un solo pico (por ejemplo, que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 100 kDa para el globulómero A $\beta$ (1-42), o de aproximadamente 60 kDa para el globulómero A $\beta$ (1-42) reticulado con glutardialdehído), respectivamente.

Comenzando con el péptido A $\beta$ (1-42), el péptido A $\beta$ (12-42) y el péptido A $\beta$ (20-42), dichos procesos son particularmente apropiados para obtener globulómeros A $\beta$ (1-42), globulómeros A $\beta$ (12-42) y globulómeros A $\beta$ (20-42).

En una realización particular de la invención, los globulómeros A $\beta$ (X-Y), donde X se selecciona del grupo que consiste en los números 2 a 24 e Y es como se definió con anterioridad, son aquellos que se obtienen cortando los globulómeros A $\beta$ (1-Y) en formas más cortas, donde X se selecciona del grupo que consiste en los números 2 a 24, donde X preferiblemente es 20 o 12, e Y es como se definió con anterioridad, lo que puede lograrse por medio de un tratamiento con proteasas apropiadas. Por ejemplo, un globulómero A $\beta$ (20-42) puede obtenerse sometiendo un globulómero A $\beta$ (1-42) a una proteólisis con termolisina, y un globulómero A $\beta$ (12-42) puede obtenerse sometiendo un globulómero A $\beta$ (1-42) a una proteólisis con endoproteinasa GluC. Cuando se alcanza el grado deseado de proteólisis, la proteasa se inactiva de una manera generalmente conocida. Después, los globulómeros resultantes pueden aislarse de acuerdo con los procedimientos ya descritos en la presente documentación y, de ser necesario, pueden someterse a un procesamiento adicional, con pasos adicionales de modificación y purificación. Se

proporciona una descripción detallada de dichos procesos en el documento WO 2004/067561, que se incorpora en el presente documento por referencia.

5 Para los propósitos de la presente invención, un globulómero A $\beta$ (1-42) es en particular el globulómero A $\beta$ (1-42), que se describe en el ejemplo 1a en la presente documentación; un globulómero A $\beta$ (20-42) es en particular el globulómero A $\beta$ (20-42), que se describe en el ejemplo 1c en la presente documentación, y un globulómero A $\beta$ (12-42) es en particular el globulómero A $\beta$ (12-42), que se describe en el ejemplo 1d en la presente documentación.

10 Preferiblemente, el globulómero presenta afinidad por células neuronales. Preferiblemente, el globulómero también presenta efectos de neuromodulación.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el globulómero consiste en entre 11 y 16, y más preferiblemente, entre 12 y 14 péptidos A $\beta$ (X-Y).

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, el término "globulómero A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en la presente documentación a un globulómero que consiste esencialmente en subunidades A $\beta$ (X-Y), donde es preferible que en promedio al menos 11 de las 12 subunidades sean del tipo A $\beta$ (X-Y), es más preferible si menos de 10 % de los globulómeros comprenden algún péptido distinto de A $\beta$ (X-Y), y es más preferible si el contenido de péptidos distintos de A $\beta$ (X-Y) es inferior al umbral de detección.

20 Más específicamente, el término "globulómero A $\beta$ (1-42)" hace referencia en la presente documentación a un globulómero que consiste esencialmente en unidades A $\beta$ (1-42), como se definió con anterioridad; el término "A $\beta$ (12-42) globulómero" hace referencia en la presente documentación a un globulómero que consiste esencialmente en unidades A $\beta$ (12-42), como se definió con anterioridad; y el término "A $\beta$ (20-42) globulómero" hace referencia en la presente documentación a un globulómero que consiste esencialmente en unidades A $\beta$ (20-42), como se definió con anterioridad.

30 El término "globulómero A $\beta$ (X-Y) reticulado" hace referencia en la presente documentación a una molécula que se obtiene por reticulación a partir de un globulómero A $\beta$ (X-Y), como se describió con anterioridad, preferiblemente por reticulación química, más preferiblemente por reticulación con aldehído, más preferiblemente por reticulación con glutardialdehído de las unidades constituyentes del globulómero. En otro aspecto de la invención, un globulómero reticulado es esencialmente un globulómero en el que las unidades están unidas al menos parcialmente por enlaces covalentes, en vez de estar unidas solamente por interacciones no covalentes. Para los propósitos de la presente invención, un globulómero reticulado A $\beta$ (1-42) es en particular el oligómero A $\beta$ (1-42) reticulado, como se describe en el ejemplo 1b en la presente documentación.

40 El término "derivado de globulómero A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en particular en la presente documentación a un globulómero que está marcado por la unión covalente a un grupo que facilita su detección, preferiblemente un fluoróforo, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, proteína fluorescente de *Aequorea victoria*, proteína fluorescente de *Dictyosoma*, o cualquier combinación o derivado fluorescente activo de estas; un cromóforo, un quimioluminóforo, por ejemplo, luciferasa, preferiblemente luciferasa de *Photinus pyralis*, luciferasa de *Vibrio fischeri*, o cualquier combinación o derivado quimioluminiscente activo de estas; un grupo con actividad enzimática, por ejemplo, peroxidasa, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, o cualquier derivado de este con actividad enzimática; un grupo denso en electrones, por ejemplo, un grupo que contiene un metal pesado, por ejemplo, un grupo que contiene oro; un hapteno, por ejemplo, un hapteno derivado de fenol; una estructura muy antigénica, por ejemplo, una secuencia peptídica con antigenicidad predicha, por ejemplo, con una antigenicidad predicha de acuerdo con el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar; un aptámero para otra molécula; un grupo quelante, por ejemplo, hexahistidinilo; una estructura proteica natural o derivada de una natural que media en otras interacciones específicas entre proteínas, por ejemplo, un miembro del par fos/jun; un grupo magnético, por ejemplo, un grupo ferromagnético; o un grupo radiactivo, por ejemplo, un grupo que comprende  $^1\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{125}\text{I}$ , o cualquier combinación de estos; o un globulómero identificado por una interacción covalente o no covalente de alta afinidad, que preferiblemente está unido de forma covalente a un grupo que facilita la inactivación, la captura, la degradación y/o la precipitación, preferiblemente identificado por un grupo que promueve la degradación *in vivo*, más preferiblemente ubiquitina, donde es particularmente preferible que este oligómero marcado se ensamble *in vivo*; o un globulómero modificado con cualquier combinación de los anteriores. Estos grupos de marca e identificación, y los métodos para unirlos a las proteínas son conocidos en la técnica. La marca y/o la identificación pueden realizarse antes, durante o después de la globulomerización. En otro aspecto de la invención, un derivado de globulómero es una molécula que se obtiene a partir de un globulómero por medio de una reacción de marca y/o identificación.

60 De forma correspondiente, el término "derivado de monómero A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en particular en la presente documentación a un monómero A $\beta$  que está marcado o identificado como se describe para el globulómero.

65 En la práctica, el anticuerpo de la presente invención se une a un globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  en el rango de entre  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M. Preferiblemente, el anticuerpo se une a un globulómero A $\beta$ (20-42) con una afinidad elevada, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad mayor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-8}$  M o con



una afinidad mayor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad mayor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-9}$  M o con una afinidad mayor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o con una afinidad mayor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-10}$  M o con una afinidad mayor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-10}$  M o con una afinidad mayor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-11}$  M o con una afinidad mayor, o con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-11}$  M o con una afinidad mayor.

5 El término “afinidad mayor” hace referencia en la presente documentación a un grado de interacción donde el equilibrio entre el anticuerpo no unido y el globulímero no unido por un lado, y el complejo anticuerpo-globulímero por otro se halla a favor del complejo anticuerpo-globulímero. Del mismo modo, el término “afinidad menor” hace referencia en la presente documentación a un grado de interacción donde el equilibrio entre el anticuerpo no unido y el globulímero no unido por un lado, y el complejo anticuerpo-globulímero por otro se halla a favor del anticuerpo no unido y el globulímero no unido. El término “afinidad mayor” es sinónimo del término “afinidad más alta”, y el término “afinidad menor” es sinónimo del término “afinidad más baja”.

15 De acuerdo con una realización particular, la invención se relaciona con un anticuerpo que se une al globulímero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  en el rango de entre  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M, y se une al globulímero A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $10^{-12}$  M o con una afinidad menor, donde la afinidad de unión por el globulímero A $\beta$ (20-42) es mayor que la afinidad de unión por el globulímero A $\beta$ (1-42).

20 Es preferible que la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención por el globulímero A $\beta$ (20-42) sea al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulímero A $\beta$ (1-42).

30 De acuerdo con una realización particular, la invención se relaciona con un anticuerpo que se une al globulímero A $\beta$ (12-42) con una  $K_D$  de  $10^{-12}$  M o con una afinidad menor, donde la afinidad de unión por el globulímero A $\beta$ (20-42) es mayor que la afinidad de unión por el globulímero A $\beta$ (12-42).

También es preferible que la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención por el globulímero A $\beta$ (20-42) sea al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulímero A $\beta$ (12-42).

40 Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención se unen a al menos un globulímero A $\beta$ , como se definió con anterioridad, y tienen una afinidad comparativamente menor por al menos una forma distinta de globulímero de A $\beta$ .

45 Los anticuerpos de la presente invención que tienen una afinidad comparativamente menor por al menos una forma distinta de globulímero de A $\beta$  que por al menos un globulímero A $\beta$  incluyen anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulímero A $\beta$ (20-42) que es mayor que por un monómero A $\beta$ (1-42). Además, es preferible que, como alternativa o adicionalmente, la afinidad de unión del anticuerpo por el globulímero A $\beta$ (20-42) sea mayor que por un monómero A $\beta$ (1-40).

50 En una realización preferida de la invención, la afinidad del anticuerpo por el globulímero A $\beta$ (20-42) es mayor que su afinidad por los monómeros A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42).

55 El término “monómero A $\beta$ (X-Y)” hace referencia en la presente documentación a la forma aislada del péptido A $\beta$ (X-Y), preferiblemente una forma del péptido A $\beta$ (X-Y) que no participa en interacciones esencialmente no covalentes con otros péptidos A $\beta$ . En términos prácticos, el monómero A $\beta$ (X-Y) usualmente se proporciona en forma de una solución acuosa. En una realización particularmente preferida de la invención, la solución acuosa de monómero contiene entre 0,05 % y 0,2 %, más preferiblemente aproximadamente 0,1 % de NH<sub>4</sub>OH. En otra realización particularmente preferida de la invención, la solución acuosa de monómero contiene entre 0,05 % y 0,2 %, más preferiblemente aproximadamente 0,1 % de NaOH. Cuando se la usa (por ejemplo, para determinar las afinidades de unión de los anticuerpos de la presente invención), puede ser necesario diluir dicha solución de manera apropiada. Además, usualmente es necesario usar dicha solución 2 horas, en particular 1 hora, y especialmente 30 minutos después de su preparación.

65 Más específicamente, el término “monómero A $\beta$ (1-40)” hace referencia en la presente documentación a una preparación de monómero A $\beta$ (1-40), como se describe en el ejemplo 2 en la presente documentación, y el término “monómero A $\beta$ (1-42)” hace referencia en la presente documentación a una preparación de A $\beta$ (1-42), como se

describe en el ejemplo 2 en la presente documentación.

En términos prácticos, el anticuerpo de la presente invención se une a uno, o más preferiblemente, a ambos monómeros con una afinidad baja, más preferiblemente, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor, o con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor, o con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor.

Es especialmente preferible que la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por uno, o más preferiblemente, ambos monómeros.

Los anticuerpos de la presente invención que tienen una afinidad comparativamente menor por al menos una forma distinta de globulómero de A $\beta$  que por al menos un globulómero A $\beta$  incluyen además anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que por las fibrillas A $\beta$ (1-42). Además, es preferible que, como alternativa o adicionalmente, la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea mayor que por las fibrillas A $\beta$ (1-40).

El término "fibrilla" hace referencia en la presente documentación a una estructura molecular que comprende ensamblajes de péptidos A $\beta$ (X-Y) individuales asociados de forma no covalente, que presentan una estructura fibrilar en el microscopio electrónico, que se unen a rojo Congo y luego presentan birrefringencia a la luz polarizada, y cuyo patrón de difracción de rayos X es una estructura  $\beta$  cruzada.

En otro aspecto de la invención, una fibrilla es una estructura molecular que se obtiene con un proceso que comprende la agregación polimérica autoinducida de un péptido A $\beta$  apropiado en ausencia de detergentes, por ejemplo, en HCl 0,1 M, lo que resulta en la formación de agregados de más de 24, preferiblemente más de 100 unidades. Este proceso es bien conocido en la técnica. En la práctica, las fibrillas A $\beta$ (X-Y) se usan en forma de una solución acuosa. En una realización particularmente preferida de la invención, la solución acuosa de fibrillas se prepara disolviendo el péptido A $\beta$  en NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %, sometiénolo a una dilución de 1:4 con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, a lo que sigue el reajuste del pH en 7,4, incubando la solución a 37 °C durante 20 horas, a lo que sigue una centrifugación a 10000 g durante 10 minutos y una resuspensión en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4.

El término "fibrilla A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en la presente documentación a una fibrilla que consiste esencialmente en subunidades A $\beta$ (X-Y), donde es preferible que en promedio al menos 90 % de las subunidades sean de tipo A $\beta$ (X-Y), más preferiblemente que al menos 98 % de las subunidades sean de tipo A $\beta$ (X-Y), y más preferiblemente que el contenido de péptidos distintos de A $\beta$ (X-Y) sea inferior al umbral de detección.

Más específicamente, el término "fibrilla A $\beta$ (1-42)" hace referencia en la presente documentación a una preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42), como se describe en el ejemplo 3 en la presente documentación.

En la práctica, el anticuerpo de la presente invención se une a una o, más preferiblemente, a ambas fibrillas con baja afinidad, más preferiblemente, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor, o con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor, o con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor.

Es especialmente preferible que la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por una o, más preferiblemente, ambas fibrillas.

De acuerdo con una realización particular, la invención se relaciona con anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que su afinidad de unión por las fibrillas tanto A $\beta$ (1-40) como A $\beta$ (1-42).

65

De acuerdo con una realización particularmente preferida, la presente invención se relaciona con anticuerpos que tienen una afinidad comparativamente menor por las formas tanto monoméricas como fibrilares de A $\beta$  que por al menos un globulómero A $\beta$ , en particular, el globulómero A $\beta$ (20-42). Estos anticuerpos se conocen de aquí en adelante como anticuerpos específicos para globulómeros.

5 Además, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que por un globulómero reticulado A $\beta$ (1-42), en particular, por un globulómero A $\beta$ (1-42) reticulado con glutardialdehído, tal como se describe en el ejemplo 1b en la presente documentación.

10 En una realización particularmente preferida de la invención, la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero reticulado A $\beta$ (1-42).

20 Los anticuerpos de la presente invención preferiblemente están aislados, en particular, son monoclonales, y más particularmente, son recombinantes.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (5F7) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7241.

25 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (10F11) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7239.

30 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (7C6) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7240.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (4B7) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7242.

35 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (6A2) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7409.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (2F2) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7408.

40 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (4D10) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7405.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (7E5) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7809.

45 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (10C1) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7810.

50 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (3B10) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7851.

Estos anticuerpos de la presente invención, 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10, se caracterizan porque tienen una afinidad de unión por un globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (1-42).

55 De acuerdo con una realización adicional los anticuerpos de la presente invención tienen un perfil de unión similar al de uno cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10. Ha de comprenderse que los anticuerpos que tienen un perfil de unión similar al de uno cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales no están limitados a los anticuerpos que tienen una afinidad de unión por un globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (1-42).

60 Los anticuerpos que tienen un perfil de unión similar al de uno cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10 incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10.

65

Todos los anticuerpos monoclonales del grupo que consiste en 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10 se unen a un epítipo contenido en el rango de la secuencia A $\beta$  20 y 42, en particular, en el rango de la secuencia A $\beta$  20-30. Sin limitar la invención a una teoría, se cree que dicho epítipo es un epítipo estructural no lineal entre las subunidades en la región de los aminoácidos 20 y 42, en particular, la región de los aminoácidos 20 y 30.

De acuerdo con otra realización los anticuerpos de la presente invención pueden competir con al menos uno, preferiblemente todos los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10.

En la presente documentación, el término "anticuerpos competitivos" hace referencia a cualquier cantidad de anticuerpos dirigidos a la misma entidad molecular o unida de forma estable, pero no covalente, preferiblemente la misma molécula, donde al menos uno es capaz de reducir específicamente la unión mensurable de otro, preferiblemente por medio del impedimento estérico del acceso del otro a su epítipo diana, o induciendo y/o estabilizando una conformación en la entidad diana que reduce la afinidad de la diana por el otro anticuerpo, que más preferiblemente bloquea directamente el acceso al otro epítipo diana mediante la unión a un epítipo que se halla suficientemente cercano al primero, que se superpone con el primero o es idéntico al primero, que más preferiblemente se superpone o es idéntico, que en particular es idéntico. En la presente documentación, se dice que dos epítipos están "superpuestos" si comparten parte de sus estructuras químicas, preferiblemente sus secuencias de aminoácidos, y se dice que son "idénticos" si sus estructuras químicas, preferiblemente sus secuencias de aminoácidos, son idénticas.

Por consiguiente, en una realización adicional los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos cuyos epítipos diana están superpuestos, que preferiblemente son idénticos al epítipo diana de al menos uno de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10.

El anticuerpo de la invención comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables. Los dos conjuntos de CDR de dominios variables se seleccionan del grupo que consiste en el conjunto de CDR de VH 5F7 y el conjunto de CDR de VL 5F7; el conjunto de CDR de VH 10F11 y el conjunto de CDR de VL 10F11; el conjunto de CDR de VH 7C6 y el conjunto de CDR de VL 7C6; el conjunto de CDR de VH 4B7 y el conjunto de CDR de VL 4B7; el conjunto de CDR de VH 2F2 y el conjunto de CDR de VL 2F2; el conjunto de CDR de VH 6A2 y el conjunto de CDR de VL 6A2; el conjunto de CDR de VH 4D10 y el conjunto de CDR de VL 4D10; el conjunto de CDR de VH 7E5 y el conjunto de CDR de VL 7E5; y el conjunto de CDR de VH 10C1 y el conjunto de CDR de VL 10C1 como se define a continuación:

<b>Conjunto de CDR de VH 5F7</b>	
VH 5F7 CDR-H1	TFYIH: restos 31-35 de SEC ID N° 3
VH 5F7 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: restos 50-66 de SEC ID N° 3
VH 5F7 CDR-H3	AKSARAAWFAY: restos 99-109 de SEC ID N° 3
<b>Conjunto de CDR de VL 5F7</b>	
VL 5F7 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: restos 24-39 de SEC ID N° 4
VL 5F7 CDR-L2	KVSNRFS: restos 55-61 de SEC ID N° 4
VL 5F7 CDR-L3	FQGSHPPT: restos 94-102 de SEC ID N° 4
<b>Conjunto de CDR de VH 10F11</b>	
VH 10F11 CDR-H1	SYVMH: restos 31-35 de SEC ID N° 7
VH 10F11 CDR-H2	YIYPYNDGTYNEKFKG: restos 50-66 de SEC ID N° 7
VH 10F11 CDR-H3	TVEGATWDGYFDV: restos 97-109 de SEC ID N° 7
<b>Conjunto de CDR de VL 10F11</b>	
VL 10F11 CDR-L1	KSSQSLLYSKGKTYLN: restos 24-39 de SEC ID N° 8
VL 10F11 CDR-L2	LVSKLDS: restos 55-61 de SEC ID N° 8
VL 10F11 CDR-L3	VQGTHFPHT: restos 94-102 de SEC ID N° 8

ES 2 527 661 T3

<b>Conjunto de CDR de VH 7C6</b>	
VH 7C6 CDR-H1	SYAMS: restos 31-35 de SEC ID Nº 11
VH 7C6 CDR-H2	SIHNRGTIFYLDSVKG: restos 50-65 de SEC ID Nº 11
VH 7C6 CDR-H3	GRSNSYAMDY: restos 98-107 de SEC ID Nº 11
<b>Conjunto de CDR de VL 7C6</b>	
VL 7C6 CDR-L1	RSTQTLVHRNGDTYPE: restos 24-39 de SEC ID Nº 12
VL 7C6 CDR-L2	KVSNRFS: restos 55-61 de SEC ID Nº 12
VL 7C6 CDR-L3	FQGSHVPYT: restos 94-102 de SEC ID Nº 12
<b>Conjunto de CDR de VH 4B7</b>	
VH 4B7 CDR-H1	DYEMV: restos 31-35 de SEC ID Nº 15
VH 4B7 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: restos 50-66 de SEC ID Nº 15
VH 4B7 CDR-H3	TLLRLHFDY: restos 99-107 de SEC ID Nº 15
<b>Conjunto de CDR de VL 4B7</b>	
VL 4B7 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQNFLA: restos 24-40 de SEC ID Nº 16
VL 4B7 CDR-L2	WASTRES: restos 56-62 de SEC ID Nº 16
VL 4B7 CDR-L3	QQYYSYPWT: restos 95-103 de SEC ID Nº 16
<b>Conjunto de CDR de VH 2F2</b>	
VH 2F2 CDR-H1	TFYIH: restos 31-35 de SEC ID Nº 19
VH 2F2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: restos 50-66 de SEC ID Nº 19
VH 2F2 CDR-H3	AKSARAAWFAY: restos 99-109 de SEC ID Nº 19
<b>Conjunto de CDR de VL 2F2</b>	
VL 2F2 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: restos 24-39 de SEC ID Nº 20
VL 2F2 CDR-L2	KVSNRFS: restos 55-61 de SEC ID Nº 20
VL 2F2 CDR-L3	FQGSHVPPT: restos 94-102 de SEC ID Nº 20
<b>Conjunto de CDR de VH 6A2</b>	
VH 6A2 CDR-H1	TFYIH: restos 31-35 de SEC ID Nº 23
VH 6A2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: restos 50-66 de SEC ID Nº 23
VH 6A2 CDR-H3	AKSHRAAWFAY: restos 99-109 de SEC ID Nº 23
<b>Conjunto de CDR de VL 6A2</b>	
VL 6A2 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: restos 24-39 de SEC ID Nº 24
VL 6A2 CDR-L2	KVSNRFF: restos 55-61 de SEC ID Nº 24
VL 6A2 CDR-L3	FQGSHVPPT: restos 94-102 de SEC ID Nº 24
<b>Conjunto de CDR de VH 4D10</b>	
VH 4D10 CDR-H1	SYGVH: restos 31-35 de SEC ID Nº 27
VH 4D10 CDR-H2	VIWRGGRIDYNAAFMS: restos 50-65 de SEC ID Nº 27
VH 4D10 CDR-H3	NSDV: restos 98-101 de SEC ID Nº 27

<b>Conjunto de CDR de VL 4D10</b>	
VL 4D10 CDR-L1	KSSQSLLDIDGKTYLN: restos 24-39 de SEC ID N° 28
VL 4D10 CDR-L2	LVSKLDS: restos 55-61 de SEC ID N° 28
VL 4D10 CDR-L3	WQGTHFPYT: restos 94-102 de SEC ID N° 28
<b>Conjunto de CDR de VH 7E5</b>	
VH 7E5 CDR-H1	DYEMV: restos 31-35 de SEC ID N° 31
VH 7E5 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: restos 50-66 de SEC ID N° 31
VH 7E5 CDR-H3	TLLRLHFDY: restos 99-107 de SEC ID N° 31
<b>Conjunto de CDR de VL 7E5</b>	
VL 7E5 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQNFLA: restos 24-40 de SEC ID N° 32
VL 7E5 CDR-L2	WASTRES: restos 56-62 de SEC ID N° 32
VL 7E5 CDR-L3	QQYYSPWT: restos 95-103 de SEC ID N° 32
<b>Conjunto de CDR de VH 10C1</b>	
VH 10C1 CDR-H1	DYEMV: restos 31-35 de SEC ID N° 35
VH 10C1 CDR-H2	YINSGSGTIHYADTVKG: restos 50-66 de SEC ID N° 35
VH 10C1 CDR-H3	TLLRLHFDY: restos 99-107 de SEC ID N° 35
<b>Conjunto de CDR de VL 10C1</b>	
VL 10C1 CDR-L1	KSSQSLFYSRNQNFLA: restos 24-40 de SEC ID N° 36
VL 10C1 CDR-L2	WASTGES: restos 56-62 de SEC ID N° 36
VL 10C1 CDR-L3	QQYFSYPWT: restos 95-103 de SEC ID N° 36
<b>Conjunto de CDR de VH 3B10</b>	
VH 3B10 CDR-H1	DYVIH: restos 31-35 de SEC ID N° 38
VH 3B10 CDR-H2	YINPYNDGTQYNEKFKG: restos 50-66 de SEC ID N° 38
VH 3B10 CDR-H3	VEGGTWDGYFDV: restos 98-109 de SEC ID N° 38

En otra realización, el anticuerpo descrito con anterioridad comprende además una región de marco aceptora humana.

- 5 En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo con una CDR injertada. Preferiblemente, el anticuerpo con una CDR injertada comprende una o más de las CDR descritas con anterioridad.

Preferiblemente, el anticuerpo con una CDR injertada comprende una región de marco aceptora humana.

- 10 En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado comprende una o más de las CDR descritas con anterioridad. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado comprende tres o más de las CDR descritas con anterioridad. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado comprende seis CDR descritas con anterioridad. En una realización particular, las CDR se incorporan en un dominio variable de un anticuerpo humano de una región de marco aceptora humana. Preferiblemente, el dominio variable del anticuerpo humano es un dominio variable humano consenso. Más preferiblemente, la región de marco aceptora humana comprende al menos una sustitución de aminoácidos en un resto clave en la región de marco, donde el resto clave se selecciona del grupo que consiste en un resto adyacente a una CDR; un resto de un sitio de glicosilación; un resto raro; un resto capaz de interactuar con un globulímero A $\beta$ (20-42); un resto capaz de interactuar con una CDR; un resto canónico; un resto de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera; un resto en una zona Vernier; y un resto en una región donde se superpone una CDR1 de cadena pesada definida por Chotia y un marco de la primera cadena pesada definida por Kabat. Preferiblemente, la región de marco aceptora humana comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región de marco, donde la secuencia de aminoácidos del marco es al menos 65 % idéntica a la secuencia de dicha
- 15
- 20

región de marco aceptora humana y comprende al menos 70 restos de aminoácidos idénticos a dicha región de marco aceptora humana.

5 En aún otro aspecto, la presente invención se relaciona con anticuerpos que comprenden la cadena pesada y la cadena ligera, como se definió con anterioridad.

10 Preferiblemente, el anticuerpo comprende dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4, SEC ID N° 7 y SEC ID N° 8 y SEC ID N° 11 y SEC ID N° 12, SEC ID N° 15 y SEC ID N° 16, SEC ID N° 19 y SEC ID N° 20, SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24, SEC ID N° 27 y SEC ID N° 28, SEC ID N° 31 y SEC ID N° 32, y SEC ID N° 35 y SEC ID N° 36.

15 En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención comprenden una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE, y las regiones constantes humanas mutantes IgG1 Ala234 Ala235. En particular, los anticuerpos comprenden una región constante humana. Más preferiblemente, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 39-42. Se prefieren los anticuerpos que comprenden una región constante de la cadena pesada de IgG1.

20 En otra realización, el anticuerpo está glicosilado. Preferiblemente, el patrón de glicosilación es un patrón de glicosilación humano o un patrón de glicosilación producido por una cualquiera de las células eucariotas descritas en la presente documentación, en particular, células CHO.

25 La presente invención también se relaciona con una porción de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención. Estas porciones de unión a antígeno incluyen, sin limitaciones, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv de una sola cadena del anticuerpo. Otras porciones de unión a antígeno son los fragmentos Fab', los fragmentos Fv y los fragmentos Fv con enlaces disulfuro.

30 En la invención también se provee un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente documentación. En otra realización, se provee un vector que comprende el ácido nucleico aislado descrito en la presente documentación. En particular, dicho vector puede seleccionarse del grupo que consiste en pcDNA; pTT (Durocher *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, N° 2); pTT3 (pTT con un sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) *Nucleic Acids Research* Vol 18, N° 17); pBV; pJV; y pBJ.

35 En otro aspecto, una célula huésped se transforma con el vector descrito en la presente documentación. Preferiblemente, la célula huésped es una célula procariota. Más preferiblemente, la célula huésped es *E. coli*. En una realización relacionada, la célula huésped es una célula eucariota. Preferiblemente, la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en una célula protista, una célula animal (por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto), una célula vegetal y una célula fúngica. Más preferiblemente, la célula huésped es una célula de mamífero, incluyendo, sin limitaciones, CHO y COS; o una célula fúngica, por ejemplo, una célula de levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*; o una célula de insecto, tal como Sf9.

45 En otro aspecto de la invención, se provee un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende cultivar una cualquiera de las células huésped, o un hibridoma descrito en la presente documentación, en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir el anticuerpo. En otra realización, se provee un anticuerpo que se obtiene con el método descrito en la presente documentación.

50 Los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse de una manera conocida per se.

Los linfocitos B, que en total contienen un repertorio de anticuerpos compuesto por cientos de miles de millones de anticuerpos con distintas especificidades de anticuerpo, son una parte del sistema inmune de los mamíferos. Una respuesta inmune normal ante un antígeno particular implica la selección de uno o más anticuerpos de dicho repertorio, que se unen específicamente a dicho antígeno, y el éxito de una respuesta inmune se basa al menos en parte en la capacidad de dichos anticuerpos de reconocer específicamente (y finalmente eliminar) el antígeno estimulador, y de ignorar otras moléculas en el ambiente de dichos anticuerpos.

60 La utilidad de los anticuerpos que reconocen específicamente un antígeno diana particular ha conducido al desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales. En la actualidad, la tecnología estandarizada de hibridomas permite producir anticuerpos con una especificidad única por un antígeno de interés. Más recientemente se han desarrollado técnicas relacionadas con anticuerpos recombinantes, tales como el análisis *in vitro* de bibliotecas de anticuerpos. Del mismo modo, estas técnicas permiten producir anticuerpos que tienen una especificidad única por un antígeno de interés.

65 En el método de la invención, puede permitirse que el antígeno de interés actúe con el repertorio de anticuerpos *in vivo* o *in vitro*.

De acuerdo con una realización, se permite que el antígeno actúe con el repertorio inmunizando un animal *in vivo* con dicho antígeno. Este enfoque *in vivo* puede comprender además establecer una cantidad de hibridomas a partir de los linfocitos de un animal, y seleccionar un hibridoma particular que secreta un anticuerpo que se une específicamente a dicho antígeno. El animal para inmunizar puede ser, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camélido o una oveja, o puede ser una versión transgénica de cualquiera de los animales mencionados con anterioridad, por ejemplo, un ratón transgénico con genes de inmunoglobulina humana, que produce anticuerpos humanos después de un estímulo antigénico. Otros tipos de animales que pueden inmunizarse incluyen ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) que han sido reconstituidos con células mononucleares de sangre periférica humana (ratones quiméricos hu-PBMC SCID) o con células linfoides o precursores de estas, y también ratones que han sido tratados con una irradiación corporal total letal, que luego han sido protegidos de la radiación con células de médula ósea de un ratón con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), y que posteriormente han sido trasplantados con linfocitos humanos funcionales (el sistema "Trimera"). Otro tipo de animal para inmunizar es un animal (por ejemplo, un ratón) en cuyo genoma se ha desactivado un gen endógeno que codifica el antígeno de interés (sometido a knock out), por ejemplo, por recombinación homóloga, de modo que, después de la inmunización con el antígeno, dicho animal reconoce dicho antígeno como extraño. Para aquellos entrenados en la técnica ha de ser obvio que los anticuerpos policlonales o monoclonales producidos con este método se caracterizan y seleccionan usando métodos de análisis conocidos que incluyen, sin limitaciones, ELISA y técnicas de transferencia puntual.

De acuerdo con otra realización, se permite que el antígeno actúe con el repertorio de anticuerpos *in vitro* analizando una biblioteca de anticuerpos recombinantes con dicho antígeno. La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede expresarse, por ejemplo, sobre la superficie de bacteriófagos, sobre la superficie de células de levadura o sobre la superficie de células bacterianas. En una variedad de realizaciones, la biblioteca de anticuerpos recombinantes es una biblioteca scFv o una biblioteca Fab, por ejemplo. De acuerdo con otra realización, las bibliotecas de anticuerpos se expresan como fusiones de ARN-proteínas.

Otro enfoque para producir los anticuerpos de la invención comprende una combinación de enfoques *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, puede permitirse que el antígeno actúe con el repertorio de anticuerpos inmunizando un animal *in vivo* con dicho antígeno, y luego analizando con dicho antígeno una biblioteca de anticuerpos recombinantes en células linfoides de dicho animal *in vitro*, o una biblioteca de dominios individuales de anticuerpos (por ejemplo, que contienen cadenas pesadas y/o ligeras). De acuerdo con otro enfoque, se permite que el antígeno actúe con el repertorio de anticuerpos inmunizando un animal *in vivo* con dicho antígeno, y luego sometiendo una biblioteca de anticuerpos recombinantes o una biblioteca de dominios individuales producida a partir de células linfoides de dicho animal a una maduración por afinidad. De acuerdo con otro enfoque, se permite que el antígeno actúe con el repertorio de anticuerpos inmunizando un animal *in vivo* con dicho antígeno, luego seleccionando células productoras de anticuerpos individuales que secreten un anticuerpo de interés, y obteniendo ADNc de la región variable de las cadenas pesada y ligera a partir de dichas células seleccionadas (por ejemplo, por PCR), y expresando dichas regiones variables de las cadenas pesada y ligera en células huésped de mamífero *in vitro* (donde esto se conoce como un método con anticuerpos de linfocitos seleccionados o SLAM), con lo que es posible seleccionar y manipular las secuencias genéticas de los anticuerpos seleccionados. Más aún, los anticuerpos monoclonales pueden seleccionarse por clonación de expresión, expresando los genes de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos en células de mamífero, y seleccionando aquellas células de mamífero que secretan un anticuerpo que tiene la afinidad de unión deseada.

En la presente invención se proveen antígenos definidos para análisis y contra-análisis. Por consiguiente, de acuerdo con la invención, es posible seleccionar aquellos anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen a un globulímero A $\beta$ (20-42) con las afinidades de unión definidas con anterioridad.

Los métodos de la invención para producir anticuerpos pueden usarse para producir diversos tipos de anticuerpos. Estos incluyen anticuerpos monoclonales, en particular, anticuerpos recombinantes, especialmente anticuerpos esencialmente humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos con CDR injertadas, y también porciones de unión a antígeno de estos.

Además, la presente invención se relaciona con un hibridoma que es capaz de producir (secretar) un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Los hibridomas de la presente invención incluyen aquellos a los que se les asignaron los números de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo seleccionados del grupo que consiste en PTA-7241, PTA-7239, PTA-7240, PTA-7242, PTA-7408, PTA-7409, PTA-7405, PTA-7809, PTA-7810 y PTA-7851.

Se observa que los anticuerpos de la presente invención también pueden reaccionar, es decir, pueden unirse a formas de A $\beta$  distintas de los globulímeros A $\beta$  descritos en la presente documentación. Estos antígenos pueden ser oligoméricos o globuloméricos, o no. Por ende, los antígenos con los cuales se unen los anticuerpos de la presente invención incluyen cualquier forma de A $\beta$  que comprende el epítipo del globulímero con la cual reaccionan los anticuerpos de la presente invención. Estas formas de A $\beta$  incluyen formas A $\beta$ (X-Y) truncadas y no truncadas (donde X e Y se definen como se describió con anterioridad), tales como las formas A $\beta$ (20-42), A $\beta$ (20-40), A $\beta$ (12-42), A $\beta$ (12-40), A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (1-40), siempre que dichas formas comprendan el epítipo del globulímero.



La presente invención también se relaciona con una composición que comprende un anticuerpo de la invención o una porción de unión a antígeno de este, como se definió con anterioridad.

5 De acuerdo con una realización particular, dicha composición es una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención o la porción de unión a antígeno de este, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

10 El anticuerpo de la invención, o la porción de unión a antígeno definida con anterioridad, preferiblemente es capaz de neutralizar, tanto *in vitro* como *in vivo*, la actividad del globulómero A $\beta$  o un derivado de este al cual se une. Por lo tanto, dicho anticuerpo o dicha porción de unión a antígeno puede usarse para inhibir la actividad de dicho globulómero o derivado de este, por ejemplo, en una preparación que contiene dicho globulómero o derivado de este, o en individuos humanos u otros mamíferos donde esté presente dicho globulómero o derivado de este.

15 De acuerdo con una realización, la invención se relaciona con un método para inhibir la actividad de dicho globulómero o derivado de este, donde el método comprende permitir que un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de este, actúe con un globulómero o un derivado de este, con el fin de inhibir la actividad de dicho globulómero o el derivado de este. Dicha actividad puede inhibirse, por ejemplo, *in vitro*. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención, o la porción de unión a antígeno, puede agregarse a una preparación, tal como una muestra derivada de un sujeto o un cultivo celular que contiene, o del que se sospecha que contiene dicho globulómero o derivado de este, con el fin de inhibir la actividad de dicho globulómero o derivado de este en dicha muestra. Como alternativa, la actividad del globulómero o el derivado de este pueden inhibirse en un individuo *in vivo*.

25 Por consiguiente, la presente invención se relaciona además con el uso de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno, como se definió con anterioridad, para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir una amiloidosis, en particular, una amiloidosis seleccionada del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer y la amiloidosis del síndrome de Down. Por ende, un aspecto de dicho uso de la invención es un método para tratar o prevenir una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en un sujeto que lo necesita, que comprende administrarle al sujeto un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se definió con anterioridad. El uso de dicho anticuerpo o dicha porción de unión a antígeno para tratar y especialmente prevenir la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, es particularmente útil para la inmunización pasiva. Por lo tanto, en el método para tratar o prevenir una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en un sujeto que lo necesita, un propósito de la administración del anticuerpo o la porción de unión a antígeno al sujeto es la inmunización pasiva del sujeto contra la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down.

40 El anticuerpo de la invención o la porción de unión a antígeno, como se definió con anterioridad, preferiblemente permiten detectar, tanto *in vitro* como *in vivo*, un globulómero A $\beta$  o un derivado de este, con el que se une. Por ende, dicho anticuerpo o dicha porción de unión a antígeno puede usarse para detectar dicho globulómero o un derivado de este, por ejemplo, en una preparación que contiene dicho globulómero o un derivado de este, o en individuos humanos u otros mamíferos donde esté presente dicho globulómero, o derivados de este.

45 De acuerdo con una realización, la invención se relaciona con un método para detectar dicho globulómero o un derivado de este, donde el método comprende permitir que un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de este, actúe con un globulómero o un derivado de este, con el fin de unir dicho globulómero, o un derivado de este (y en consecuencia, preferiblemente formar un complejo que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de este, y el globulómero o el derivado de este). Por ejemplo, dicho globulómero puede detectarse *in vitro*. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención, o la porción de unión a antígeno, puede agregarse a una preparación, por ejemplo, una muestra derivada de un sujeto, o un cultivo celular que contiene, o del que se sospecha que contiene dicho globulómero o un derivado de este, con el objeto de detectar dicho globulómero o un derivado de este en dicha preparación. Como alternativa, el globulómero o el derivado de este pueden detectarse en un individuo *in vivo*.

55 Por lo tanto, la presente invención se relaciona además con el uso de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se definió con anterioridad para preparar una composición para diagnosticar una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down. Un aspecto de dicho uso de la invención es un método para diagnosticar una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en un sujeto del que se sospecha que tiene la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, que comprende administrarle al sujeto un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se definió con anterioridad, y detectar la formación de un complejo que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno con el antígeno, donde la presencia del complejo indica la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en el sujeto. Un segundo aspecto de dicho uso de la invención es un método para diagnosticar una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en un sujeto del que se sospecha que tiene la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, que comprende

proporcionar una muestra del sujeto, poner en contacto la muestra con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se definió con anterioridad, y detectar la formación de un complejo que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno con el antígeno, donde la presencia del complejo indica la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en el sujeto.

5

### Descripción detallada de la invención

Las afinidades de unión de los anticuerpos de la invención pueden evaluarse usando inmunoensayos estandarizados *in vitro*, tales como análisis de ELISA, transferencia puntual o BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para hallar descripciones, véanse Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnsson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

10

De acuerdo con una realización particular, las afinidades definidas en la presente documentación hacen referencia a los valores obtenidos llevando a cabo una transferencia puntual, como se describe en el ejemplo 8, y evaluándolo por densitometría. De acuerdo con una realización particular de la invención, la determinación de la afinidad de unión por transferencia puntual comprende lo siguiente: se transfiere una cantidad determinada del antígeno (por ejemplo, el globulímero A $\beta$ (X-Y), el monómero A $\beta$ (X-Y) o las fibrillas A $\beta$ (X-Y), como se definió con anterioridad), o en la práctica, una dilución apropiada de este, por ejemplo, en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA, a una concentración de antígeno, por ejemplo, de 100 pmol/ $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l, 1 pmol/ $\mu$ l, 0,1 pmol/ $\mu$ l y 0,01 pmol/ $\mu$ l, en una membrana de nitrocelulosa, luego la membrana se bloquea con leche para prevenir la unión no específica y se lava, luego se la pone en contacto con el anticuerpo de interés, a lo que sigue la detección de este último por medio de un anticuerpo secundario conjugado a una enzima y una reacción colorimétrica; a concentraciones de anticuerpos definidas, donde la cantidad de anticuerpo unido permite determinar la afinidad. Por ende, la afinidad relativa de los dos anticuerpos diferentes por una diana, o de un anticuerpo por dos dianas diferentes, se define en la presente documentación como la relación de las cantidades respectivas del anticuerpo unido a la diana observadas con las dos combinaciones de anticuerpo-diana, bajo condiciones de transferencia puntual idénticas en el resto de los aspectos. A diferencia de un enfoque similar basado en transferencia de Western, el enfoque de transferencia puntual permite determinar la afinidad de un anticuerpo por una diana dada en su conformación natural; a diferencia del enfoque de ELISA, el enfoque de transferencia puntual no sufre diferencias en las afinidades entre las distintas dianas y la matriz, por lo que permite realizar comparaciones más precisas entre distintas dianas.

15

20

25

30

35

El término "K<sub>d</sub>", como se usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, que es conocida en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención preferiblemente son anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado" hace referencia a un anticuerpo que tiene las afinidades de unión descritas con anterioridad, y que está esencialmente libre de otros anticuerpos que tienen distintas afinidades de unión. El término "esencialmente libre" hace referencia en la presente documentación a una preparación de anticuerpos donde al menos 95 % de los anticuerpos, preferiblemente al menos 98 % de los anticuerpos, y más preferiblemente, al menos 99 % de los anticuerpos tienen la afinidad de unión deseada. Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

40

Los anticuerpos aislados de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales. Un "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente documentación, hace referencia a una preparación de moléculas de anticuerpo, anticuerpos que comparten una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada en común y la cadena ligera en común, en contraste con las preparaciones de anticuerpos "policlonales", que contienen una mezcla de anticuerpos con secuencias de aminoácidos diferentes. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse con diversas tecnologías nuevas, tales como presentaciones de fagos, bacterias, levaduras o ribosómicas, y también con métodos clásicos, por ejemplo, anticuerpos derivados de hibridomas (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado con tecnología de hibridomas, tal como la metodología convencional de hibridomas de Kohler y Milstein ((1975) *Nature* 256:495-497). Por lo tanto, un anticuerpo no derivado de un hibridoma con una secuencia uniforme aún se conoce como anticuerpo monoclonal en la presente documentación, aunque haya sido obtenido con metodologías no clásicas, y el término "monoclonal" no se restringe a los anticuerpos derivados de hibridomas, sino que se usa para hacer referencia a todos los derivados de un clon de ácidos nucleicos.

45

50

55

Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos recombinantes. En la presente documentación, el término "recombinante" hace referencia a cualquier combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otro modo estarían separados, por ejemplo, por síntesis química o mediante la manipulación de segmentos de ácidos nucleicos aislados con técnicas de ingeniería genética. En particular, el término "anticuerpos recombinante" hace referencia a anticuerpos que se producen, se expresan, se generan o se aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula huésped; anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes; anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico debido a la presencia de genes de inmunoglobulina humanos (véase, por ejemplo, Taylor, L.D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.*

60

65

20:6287-6295); o anticuerpos que se producen, se expresan, se generan o se aíslan de cualquier otro modo, en los que se ensamblan secuencias génicas de inmunoglobulina particulares (tales como secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas) con otras secuencias de ADN. Los anticuerpos recombinantes incluyen, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, con CDR injertadas y humanizados. Aquel entrenado en la técnica ha de saber que la expresión de un anticuerpo monoclonal convencional derivado de un hibridoma en un sistema heterólogo requerirá la generación de un anticuerpo recombinante, aún si la secuencia de aminoácidos de la proteína del anticuerpo resultante no cambia, o no se desea cambiarla.

En una realización particular de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

De acuerdo con una multiplicidad de realizaciones, el anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos derivada completamente de una sola especie, tal como un anticuerpo humano o un anticuerpo de ratón. De acuerdo con otras realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo con CDR injertadas, u otra forma de anticuerpo humanizado.

El término "anticuerpo" hace referencia a moléculas de inmunoglobulina que consisten en 4 cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas comúnmente están conectadas unas con otras a través de enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de dicha cadena pesada (abreviada en la presente documentación como HCVR o VH) y una región constante de dicha cadena pesada. La región constante de la cadena pesada consiste en tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de dicha cadena ligera (abreviada en la presente documentación como LCVR o VL) y una región constante de dicha cadena ligera. La región constante de la cadena ligera consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco (FR). Por consiguiente, cada región VH y VL consiste en tres CDR y cuatro FR, que están dispuestas entre el extremo N y el extremo C en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Esta estructura es bien conocida por aquellos entrenados en la técnica.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo") hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo de la invención, donde dicho o dichos fragmentos aún tienen las afinidades de unión definidas con anterioridad. Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden cumplir la función de unión a antígeno de un anticuerpo. De acuerdo con el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, los ejemplos de fragmentos de unión incluyen (i) un fragmento Fab, es decir, un fragmento monovalente compuesto por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, es decir, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd compuesto por los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv compuesto por los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH o de VH, CH1, CH2, DH3, o VH, CH2, CH3; y (vi) una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada. Aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden conectarse uno con otro usando un conector sintético, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos poli-G<sub>4</sub>S, y métodos recombinantes, lo que permite prepararlos como una proteína de una sola cadena, donde se combinan las regiones VL y VH para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (ScFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se entiende que el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo abarca estos anticuerpos de una sola cadena. Del mismo modo, otras formas de anticuerpos de una sola cadena, tales como los "diacuerpos", también están incluidas en la presente documentación. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, con lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina hace referencia a un dominio constante de la cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de la IgG humana son conocidas en la técnica y se representan en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia del dominio constante de la cadena pesada y el dominio constante de la cadena ligera de la IgG humana

Proteína	ID de la secuencia	Secuencia
región constante Ig gamma-1	SEC ID N° 39	12345678901234567890123456789012 ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

Proteína	ID de la secuencia	Secuencia
región constante mutante Ig gamma-1	SEC ID N° 40	QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
región constante Ig Kappa	SEC ID N° 41	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDST YLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
región constante Ig Lambda	SEC ID N° 42	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

- Además, un anticuerpo de la presente invención, o una porción de unión a antígeno de este, puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente de dicho anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales. Para dichas moléculas de inmunoadhesión, es relevante el uso de la región principal de la estreptavidina en la preparación de una molécula tetramérica scFv (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidinilo C-terminal, por ejemplo, hexahistidinilo, en la producción de moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058).
- 5 El término “anticuerpo humano” hace referencia a anticuerpos cuyas regiones variable y constante corresponden o derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana, como se describe, por ejemplo, en Kabat *et al.* (véase Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242). Sin embargo, los anticuerpos humanos de la invención pueden contener restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que han sido introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio *in vitro*, o por mutaciones somáticas *in vivo*), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3. Los anticuerpos humanos recombinantes de la invención tienen regiones variables, y también pueden contener regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (véase Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242). Sin embargo, de acuerdo con realizaciones particulares, estos anticuerpos humanos recombinantes están sometidos a mutagénesis *in vitro* (o a una mutagénesis somática *in vivo*, si se usa un animal que es transgénico debido a secuencias de Ig humanas), por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque están relacionadas o derivan de secuencias VH y VL de la línea germinal humana, no existen naturalmente *in vivo* en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana. De acuerdo con realizaciones particulares, los anticuerpos recombinantes de este tipo son el resultado de mutagénesis selectiva o retromutación, o ambas. Preferiblemente, la mutagénesis resulta en una afinidad por la diana que es mayor, y/o una afinidad por estructuras distintas de la diana que es menor que la del anticuerpo progenitor.
- 10 El término “anticuerpo quimérico” hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de una especie, y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas unidas a regiones constantes humanas.
- 15 El término “anticuerpo con una CDR injertada” hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de las cadenas pesada y ligera de una especie, pero en las que las secuencias de una o más regiones CDR de VH y/o VL han sido reemplazadas por secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas, en las que una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas por secuencias CDR humanas.
- 20 El término “anticuerpo humanizado” hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, pollo, camélidos, ovejas o
- 25
- 30
- 35
- 40

cabras), pero en las que al menos una parte de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para que sean más "similares a humanos", es decir, para que sean más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo con CDR injertadas en el que las secuencias CDR humanas han sido insertadas en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "nomenclatura de Kabat" se usan indistintamente en la presente documentación. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, hacen referencia a un sistema para numerar los restos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros restos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de este (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391, y Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 31 a 35 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 24 a 34 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Como se los usa en la presente documentación, los términos "acceptor" y "anticuerpo acceptor" hacen referencia al anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o 100 % de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. En algunas realizaciones, el término "acceptor" hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica la región o las regiones constantes. En aún otra realización, el término "acceptor" hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones de marco y la región o las regiones constantes. En una realización específica, el término "acceptor" hace referencia a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de un anticuerpo humano que proporciona o codifica al menos 80 %, preferiblemente, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o 100 % de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. De acuerdo con esta realización, un acceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 restos de aminoácidos que no aparecen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región de marco aceptora y/o una región o regiones constantes aceptoras, por ejemplo, puede derivar o puede obtenerse a partir de un gen de un anticuerpo de la línea germinal, un gen de un anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Como se usa en la presente documentación, el término "CDR" hace referencia a la región de determinación de la complementariedad dentro de las secuencias variables de un anticuerpo. Para cada una de las regiones variables, hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. El término "conjunto de CDR", como se usa en la presente documentación, hace referencia a un grupo de tres CDR que aparecen en una sola región variable que permiten la unión al antígeno. Los límites exactos de estas CDR han sido definidos en distintos términos de acuerdo con distintos sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solamente provee un sistema de numeración no ambiguo de los restos que puede aplicarse a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites precisos para los restos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR Kabat. Chotia y colaboradores (Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y Chotia *et al.*, *Nature* 342:877-883 (1989)) descubrieron que determinadas sub-porciones dentro de las CDR Kabat adoptan conformaciones casi idénticas del esqueleto peptídico, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se denominaron L1, L2 y L3, o H1, H2 y H3, donde "L" y "H" hacen referencia a las regiones de la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR Chotia, que tienen límites que se superponen con las CDR Kabat. Otros límites que definen CDR que se superponen con las CDR de Kabat han sido descritos por Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) y MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero aun así se superponen con las CDR Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la luz de las predicciones o los descubrimientos experimentales de que restos o grupos de restos particulares, o aún CDR completas, no afectan significativamente a la unión al antígeno. En los métodos usados en la presente documentación pueden emplearse CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque en realizaciones preferidas se usan CDR definidas de acuerdo con Kabat o Chotia.

Como se usa en la presente documentación, el término resto "canónico" hace referencia a un resto en una CDR o un marco que define una estructura canónica de CDR particular, como lo definen Chotia *et al.* (*J. Mol. Biol.* 196:901-907 (1987); Chotia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227:799 (1992), ambos se incorporan en el presente documento por referencia). De acuerdo con Chotia *et al.*, las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica específica principalmente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de restos de aminoácidos que forman un rizo.

Como se usan en la presente documentación, los términos "donante" y "anticuerpo donante" hacen referencia a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones de marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donante" hace referencia a un anticuerpo no humano que

5

Como se usa en la presente documentación, el término "marco" o "secuencia de marco" hace referencia a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Como la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse usando distintos sistemas, el significado de una secuencia de marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, L2 y L3 de la cadena ligera, y CDR-H1, H2 y H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones de marco en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 está localizada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, tal como la han definido otros, representa las FR combinadas en la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina de origen natural. Como se la usa en la presente documentación, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FR representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

10

15

Las secuenciasceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humana son conocidas en la técnica.

20

Como se usa en la presente documentación, el término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" hace referencia a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han pasado por el proceso de maduración que resulta en la redistribución genética y la mutación para expresar una inmunoglobulina particular (véanse, por ejemplo, Shapiro *et al.*, Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis *et al.*, Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por las diversas realizaciones de la presente invención deriva del descubrimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen mayores probabilidades que los genes de anticuerpos maduros de conservar estructuras esenciales en su secuencia de aminoácidos que son propias de los individuos de la especie, por lo que es menos probable que no sean reconocidos como propios cuando se los use en dicha especie.

25

30

Como se usa en la presente documentación, el término restos "clave" hace referencia a determinados restos dentro de la región variable que tienen un impacto mayor sobre la especificidad y/o la afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un resto clave incluye, sin limitaciones, uno o más de los siguientes: un resto que se halla adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (que puede ser un sitio de N u O-glicosilación), un resto raro, un resto capaz de interactuar con el antígeno, un resto capaz de interactuar con una CDR, un resto canónico, un resto de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, un resto en la zona de Vernier, y un resto en la región donde se superpone una CDR1 de cadena pesada definida por Chotia y un marco de la primera cadena pesada definida por Kabat.

35

40

Como se usa en la presente documentación, el término "anticuerpo humanizado" hace referencia específicamente a un anticuerpo, o una variante, un derivado, un análogo o un fragmento de este que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de interés, y que comprende una región de marco (FR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región de determinación de la complementariedad (CDR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa en la presente documentación, el término "sustancialmente", en el contexto de una CDR, hace referencia a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, preferiblemente al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado sustancialmente comprende la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv), donde todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donante), y todas o sustancialmente todas las regiones de marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o una cadena pesada humanizada.

45

50

55

60

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier subclase, incluyendo, sin limitaciones, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

65

No es necesario que las regiones de marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias progenitoras; por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso puede haber sido mutada mediante la sustitución, la inserción y/o la supresión de al menos un resto de aminoácido, de modo que el resto de la CDR o el marco en dicho sitio no corresponde exactamente al anticuerpo donante o al marco consenso.

Sin embargo, en una realización preferida, estas mutaciones no son extensas. Comúnmente, al menos 80 %, preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente, al menos 90 %, y más preferiblemente, al menos 95 % de los restos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de las FR y CDR progenitoras. Como se usa en la presente documentación, el término "marco consenso" hace referencia a la región de marco en la secuencia de la inmunoglobulina consenso. Como se usa en la presente documentación, el término "secuencia de inmunoglobulina consenso" hace referencia a la secuencia formada con los aminoácidos (o nucleótidos) de aparición más frecuente en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987)). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con mayor frecuencia en dicha posición en la familia. Cuando dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso.

Como se usa en la presente documentación, la zona "Vernier" hace referencia a un subconjunto de restos del marco que pueden ajustar la estructura de la CDR y afinar la adaptación al antígeno como lo describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, que se incorpora en el presente documento por referencia). Los restos de la zona Vernier forman una capa que queda debajo de las CDR, y pueden afectar a la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

El término "epítipo" incluye cualquier polipéptido determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, los epítipos determinantes incluyen agrupaciones superficiales de moléculas con actividad química, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos o sulfonilos, y, en determinadas realizaciones, pueden tener características específicas en su estructura tridimensional y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno con la que se une un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de forma preferencial su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "polinucleótido", como se usa en la presente documentación, hace referencia a una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de cadena simple y doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

El término "polinucleótido aislado", como se usa en la presente documentación, hace referencia a un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, de ADNc o sintético, o cualquier combinación de estos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido con el que normalmente el "polinucleótido aislado" se halla asociado en la naturaleza; que está unido operativamente a un polinucleótido con el que normalmente no se halla unido en la naturaleza; o que no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "vector", como se usa en la presente documentación, hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que hace referencia a un ADN circular de cadena doble con el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, que permite unir segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de forma autónoma en la célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras introducirse en la célula huésped, y por lo que se replican junto con el genoma del huésped. Más aún, determinados vectores pueden dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente. Estos vectores se conocen en la presente documentación como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles para los protocolos de ADN recombinante comúnmente toman la forma de plásmidos. En esta solicitud, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector de uso más común. Sin embargo, en la invención han de incluirse otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que cumplen funciones equivalentes.

El término "unido operativamente" hace referencia a una yuxtaposición donde los componentes descritos se hallan en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está conectada de modo tal que la expresión de la secuencia codificante se obtiene bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que se hallan contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", como se usa en la presente documentación, hace referencia a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para obtener la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están unidas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas para el inicio de la transcripción, la terminación, secuencias promotoras y potenciadoras; señales eficaces para el procesamiento del ARN, tales como secuencias de separación y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la

estabilidad de las proteínas; y cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de estas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, estas secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de unión a ribosomas y secuencias de terminación de la transcripción. En eucariotas, en general, estas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias directrices y secuencias que son asociados de fusión.

La "transformación", como se define en la presente documentación, hace referencia a cualquier proceso con el cual el ADN exógeno ingresa en una célula huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para insertar secuencias de ácidos nucleicos extrañas en células huésped procariotas o eucariotas. El método se selecciona sobre la base de la célula huésped para transformar, y puede incluir, sin limitaciones, la infección viral, la electroporación, la lipofección y el bombardeo de partículas. Estas células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable, en las que el ADN insertado puede replicarse como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del huésped. También incluyen células que expresan de forma transitoria el ADN o el ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en la presente documentación, hace referencia a la célula en la que se introduce ADN exógeno. Ha de comprenderse que estos términos no solamente hacen referencia a la célula sujeto particular, sino también a la descendencia de dicha célula. Como es posible que ocurran determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, de hecho, esta descendencia puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del término "célula huésped", tal como se usa en la presente documentación. Preferiblemente, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Más preferiblemente, las células huésped incluyen, sin limitaciones, células procariotas de la línea de *E. coli*; las líneas de células de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Es posible usar procedimientos convencionales para producir ADN recombinante, sintetizar oligonucleótidos y cultivar y transformar tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, de maneras conocidas en la técnica o como se describe en la presente documentación. Los protocolos y los procedimientos anteriores pueden llevarse a cabo en general de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en esta memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia para cualquier propósito.

Un "organismo transgénico", como es conocido en la técnica y como se usa en la presente documentación, hace referencia a un organismo que tiene células que contienen un transgén, donde el transgén introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgén" es una construcción de ADN que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un organismo transgénico, que dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

A continuación se describen métodos para producir los anticuerpos de la invención. Se hace una distinción entre los enfoques *in vivo*, los enfoques *in vitro* o una combinación de ambos.

A continuación se describen algunos métodos para producir los anticuerpos de la invención. Se hace una distinción entre los enfoques *in vivo*, los enfoques *in vitro* o una combinación de ambos.

#### Enfoques *in vivo*

Dependiendo del tipo de anticuerpo deseado, pueden usarse diversos animales huésped para la inmunización *in vivo*. Puede usarse un huésped que expresa una versión endógena del antígeno de interés. Como alternativa, es posible usar un huésped en el que se ha introducido una deficiencia en una versión endógena del antígeno de interés. Por ejemplo, se ha demostrado que los ratones en los que se ha introducido una deficiencia de una proteína endógena particular por recombinación homóloga en el gen endógeno correspondiente (es decir, ratones sometidos a knockout) generan una respuesta humoral a la proteína con la que han sido inmunizados, por lo que pueden usarse para la producción de anticuerpos monoclonales de alta afinidad por la proteína (véase, por ejemplo, Roes, J. *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 183:231-237; Lunn, M.P. *et al.* (2000) *J. Neurochem.* 75:404-412).

Una multiplicidad de mamíferos no humanos son huéspedes apropiados para la producción de anticuerpos para producir los anticuerpos no humanos de acuerdo con la invención. Dichos animales incluyen ratones, ratas, pollos, camélidos, conejos, ovejas y cabras (y versiones de estos sometidas a knockout), aunque para la producción de



5 hibridomas se prefieren los ratones. Además, un animal huésped no humano que expresa un repertorio de anticuerpos humanos puede usarse para producir anticuerpos esencialmente humanos contra un antígeno humano con especificidad doble. Los animales no humanos de este tipo incluyen animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que contienen transgenes de inmunoglobulina humana (ratones quiméricos hu-PBMC SCID) y quimeras de irradiación de humano/ratón, que se describirán con mayor detalle más adelante.

10 De acuerdo con una realización, el animal inmunizado con el globulímero A $\beta$ (20-42) o el derivado de este es un mamífero no humano, preferiblemente un ratón, que es transgénico debido a la presencia de genes de inmunoglobulina humana, de modo que dicho mamífero no humano produce anticuerpos humanos al ser estimulado con antígenos. Típicamente, los transgenes de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina con la configuración de la línea germinal humana se introducen en animales que han sido alterados, de modo que sus loci endógenos de las cadenas pesada y ligera están inactivos. Si estos animales se estimulan con un antígeno (por ejemplo, con un antígeno humano), se producen anticuerpos derivados de las secuencias de inmunoglobulina humana (anticuerpos humanos). Es posible producir anticuerpos humanos monoclonales a partir de los linfocitos de dichos animales, por medio de una tecnología estandarizada de hibridomas. Para hallar una descripción más detallada de ratones transgénicos con inmunoglobulinas humanas y su uso en la producción de anticuerpos humanos, véanse, por ejemplo, los documentos US 5939598, WO 96/33735, WO 96/34096, WO 98/24893 y WO 99/53049 (Abgenix Inc.), y US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5661016, US 5770429, US 5814318, US 5877397 y WO 99/45962 (Genpharm Inc.); véanse también MacQuitty, J.J. y Kay, R.M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, L.D. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding, F.A. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. M. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; Mendez, M. J. *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Green, L.L. y Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483-495; Green, L.L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X.D. *et al.* (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401-410; Gallo, M.L. *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534-540.

30 De acuerdo con otra realización, el animal que se inmuniza con el globulímero A $\beta$ (20-42) o el derivado de este puede ser un ratón con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) que ha sido reconstituido con células mononucleares de sangre periférica humana, células linfoides o precursores de estas. Estos ratones, que se conocen como ratones hu-PBMC quiméricos, producen inmunoglobulina humana en respuesta a los estímulos con antígenos, tal como se ha demostrado. Para hallar una descripción más detallada de estos ratones y su uso en la generación de anticuerpos, véanse, por ejemplo, Leader, K.A. *et al.* (1992) *Immunology* 76:229-234; Bombil, F. *et al.* (1996) *Immunobiol.* 195:360-375; Murphy, W.J. *et al.* (1996) *Semin. Immunol.* 8:233-241; Herz, U. *et al.* (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:150-152; Albert, S.E. *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:1393-1403; Nguyen, H. *et al.* (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Arai, K. *et al.* (1998) *J. Immunol. Methods* 217:79-85; Yoshinari, K. y Arai, K. (1998) *Hibridoma* 17:41-45; Hutchins, W.A. *et al.* (1999) *Hybridoma* 18:121-129; Murphy, W.J. *et al.* (1999) *Clin. Immunol.* 90:22-27; Smithson, S.L. *et al.* (1999) *Mol. Immunol.* 36:113-124; Chamat, S. *et al.* (1999) *J. Infect. Diseases* 180:268-277; y Heard, C. *et al.* (1999) *Molec. Med.* 5:35-45.

40 De acuerdo con otra realización, el animal que ha sido inmunizado con el globulímero A $\beta$ (20-42) o un derivado de este es un ratón que ha sido tratado con una dosis letal de irradiación corporal total, que luego ha sido protegido de la radiación con células de médula ósea de un ratón con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), y que posteriormente ha sido trasplantado con linfocitos humanos funcionales. Este tipo de quimera, conocida como el sistema Trimer, se usa para producir anticuerpos humanos monoclonales mediante la inmunización de dichos ratones con el antígeno de interés, a lo que sigue la producción de los anticuerpos monoclonales usando tecnología estandarizada de hibridomas. Para hallar una descripción más detallada de estos ratones y su uso en la generación de anticuerpos, véanse, por ejemplo, Eren, R. *et al.* (1998) *Immunology* 93:154-161; Reisner, Y y Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16:242-246; Ilan, E. *et al.* (1999) *Hepatology* 29:553-562; y Bocher, W.O. *et al.* (1999) *Immunology* 96:634-641.

50 Comenzando con las células productoras de anticuerpos generadas *in vivo*, es posible producir anticuerpos monoclonales con técnicas estandarizadas, tales como la técnica de hibridomas descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) (véanse también Brown *et al.* (1981) *J. Immunol* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J Biol Chem* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *PNAS* 76:2927-31; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). La tecnología para producir hibridomas con anticuerpos monoclonales es suficientemente conocida (véanse en general R. H. Kenneth, en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3:231-36). Brevemente, se fusiona una línea celular inmortalizada (típicamente un mieloma) con linfocitos (típicamente esplenocitos, células de ganglios linfáticos o linfocitos de sangre periférica) de un mamífero inmunizado con el globulímero A $\beta$  de la invención o un derivado de este, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se analizan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Para este propósito, puede aplicarse cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas (véanse también G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:550-52; Gefter *et al.* *Somatic Cell Genet.*, citado con anterioridad; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, citado con anterioridad; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citado con anterioridad). Más aún, aquel entrenado en la técnica ha de apreciar que hay diversas variaciones de dichos métodos que son igualmente útiles. Típicamente, la línea celular

inmortalizada (por ejemplo, una línea de células de mieloma) deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, es posible establecer hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la invención con una línea celular inmortalizada de ratón. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son líneas de células de mieloma de ratón que son sensibles a un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT). Es posible usar cualquiera de una cantidad de líneas de células de mieloma como asociado de fusión por omisión, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de células de mieloma están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD. Típicamente se fusionan células de mieloma de ratón sensibles a HAT con esplenocitos de ratón usando polietilenglicol (PEG). Después, las células de hibridomas que resultan de la fusión se seleccionan usando un medio HAT, con lo que se matan las células de mieloma no fusionadas y fusionadas de forma no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de unos pocos días porque no han sido transformados). Las células de hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales de la invención se identifican analizando los sobrenadantes de cultivo de hibridomas en busca de dichos anticuerpos, por ejemplo, usando un ensayo de transferencia puntual, como se describió con anterioridad y como se describirá en el ejemplo 8, con el objeto de seleccionar aquellos anticuerpos que tienen las afinidades de unión definidas con anterioridad.

Los anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10 fueron generados usando el enfoque *in vivo* descrito con anterioridad, y se obtuvieron a partir de un hibridoma como se definió en la presente documentación.

Del mismo modo, dicho hibridoma puede usarse como fuente de ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y/o pesadas para producir los anticuerpos de la presente invención por medios recombinantes, como se describirá con mayor detalle más adelante.

#### Enfoques *in vitro*

Como alternativa a la producción de los anticuerpos de la invención por inmunización y selección, los anticuerpos de la invención pueden identificarse y aislarse analizando bibliotecas de combinación de inmunoglobulinas recombinantes con el globulímero A $\beta$ (20-42) o un derivado de este, para de esta manera aislar miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que tienen la afinidad de unión requerida. Los conjuntos de elementos para generar y analizar bibliotecas de presentación están disponibles comercialmente (por ejemplo, el sistema de anticuerpos de fagos recombinantes de Pharmacia, N° de catálogo 27-9400-01; y el conjunto de elementos de presentación de fagos Stratagene SurfZAP<sup>®</sup>, N° de catálogo 240612). En muchas realizaciones, la biblioteca de presentación es una biblioteca de scFv o una biblioteca de Fab. La técnica de presentación de fagos para analizar bibliotecas de anticuerpos recombinantes ha sido descrita apropiadamente. Los ejemplos de métodos y compuestos que pueden usarse de una forma particularmente ventajosa para generar y analizar bibliotecas de presentación de anticuerpos pueden hallarse, por ejemplo, en los documentos McCafferty *et al.* WO 92/01047, US 5969108 y EP 589 877 (donde se describen en particular las presentaciones de scFv), Ladner *et al.* US 5223409, US 5403484, US 5571698, US 5837500 y EP 436 597 (donde se describe la fusión pIII, por ejemplo); Dower *et al.* WO 91/17271, US 5427908, US 5580717 y EP 527 839 (donde se describen en particular presentaciones de Fab); Winter *et al.* Publicación Internacional WO 92/20791 y EP 368.684 (donde se describe en particular la clonación de secuencias de dominios variables de inmunoglobulinas); Griffiths *et al.* US 5885793 y EP 589 877 (donde se describe en particular el aislamiento de anticuerpos humanos para antígenos humanos usando bibliotecas recombinantes); Garrard *et al.* WO 92/09690 (donde se describen en particular las técnicas de expresión de fagos); Knappik *et al.* WO 97/08320 (donde se describe la biblioteca de anticuerpos recombinantes humanos HuCal); Salfeld *et al.* WO 97/29131 (donde se describe la producción de un anticuerpo humano recombinante para un antígeno humano (factor de necrosis tumoral alfa), y también la maduración *in vitro* por afinidad del anticuerpos recombinante); y Salfeld *et al.* Solicitud Provisional de los EEUU N° 60/126603 y las solicitudes de patentes basadas en ella (donde también se describe la producción de anticuerpos humanos recombinantes contra antígenos humanos (interleucina-12 humana), y también la maduración *in vitro* por afinidad del anticuerpo recombinante).

Pueden hallarse descripciones adicionales de análisis de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en publicaciones científicas tales como Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982; McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554; y Knappik *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86.

Como alternativa al uso de sistemas de presentación de bacteriófagos, pueden expresarse bibliotecas de anticuerpos recombinantes en la superficie de células de levadura o células bacterianas. En el documento WO 99/36569 se describen métodos para preparar y analizar bibliotecas expresadas en la superficie de células de levadura. En el documento WO 98/49286 se describen con mayor detalle métodos para preparar y analizar bibliotecas expresadas sobre la superficie de células bacterianas.

En todos los enfoques *in vitro*, un método de selección para incrementar el contenido de anticuerpos recombinantes con las propiedades deseadas constituye una parte importante del proceso, que generalmente se conoce como "selección" y comúnmente toma la forma de una cromatografía de afinidad sobre columnas en cuya matriz se ha unido la estructura diana. Después, las moléculas diana prometedoras se someten a la determinación individual de sus afinidades absolutas y/o relativas, preferiblemente por medio de un ensayo de transferencia puntual estandarizado, como se describió con anterioridad y como se describirá en el ejemplo 8.

Una vez que un anticuerpo de interés de una biblioteca de combinación ha sido identificado y caracterizado en un grado suficiente, las secuencias de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de dicho anticuerpo se aíslan por medio de técnicas convencionales de biología molecular, por ejemplo, mediante la amplificación por PCR de ADN del conjunto de presentación (por ejemplo, el fago) que fue aislado durante el análisis de la biblioteca. Las secuencias de nucleótidos de los genes de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo que pueden usarse para preparar cebadores de ARN son bien conocidas por aquellos entrenados en la técnica. Se describen varias de estas secuencias, por ejemplo, en Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242, y en la base de datos de la línea germinal humana VBASE.

Un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención puede producirse expresando de forma recombinante los genes de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina en una célula huésped. Con el fin de expresar de forma recombinante un anticuerpo, una célula huésped se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que contienen fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina de dicho anticuerpo, con lo que se expresan las cadenas ligera y pesada en la célula huésped, y preferiblemente se las secreta en el medio donde se cultivan dichas células huésped. Los anticuerpos pueden aislarse a partir de este medio. Se usan métodos de ADN recombinante convencionales para obtener genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, para insertar dichos genes en vectores de expresión recombinantes, y para introducir dichos vectores en células huésped. Los métodos de este tipo se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch y Maniatis (editores), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. *et al.* (editores) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989), y en el documento US 4816397, por Boss *et al.*

Una vez que se han obtenido fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL del anticuerpo de interés, dichos fragmentos de ADN pueden someterse a manipulaciones adicionales usando técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de regiones variables en genes de cadenas de anticuerpos completas, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. Estas manipulaciones comprenden unir operativamente un fragmento de ADN que codifica VL o VH con otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, por ejemplo, la región constante de un anticuerpo o un conector flexible. Ha de interpretarse que el término "unidos operativamente" denota que los dos fragmentos de ADN están unidos de modo tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por dichos dos fragmentos de ADN permanecen en el mismo marco.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de una cadena pesada completa uniendo operativamente el ADN que codifica la región VH con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son bien conocidas (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242), y los fragmentos de ADN que incluyen dichas regiones pueden obtenerse por medio de una amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgE o IgD, y preferiblemente es una región constante de IgG, en particular, IgG1 o IgG4. Para obtener un gen de un fragmento Fab de una cadena pesada, el ADN que codifica VH puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica meramente la región constante de la cadena pesada CH1.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de una cadena ligera completa (y un gen de una cadena ligera Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana son bien conocidas (véase Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242), y los fragmentos de ADN que incluyen dichas regiones pueden obtenerse por medio de una amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, de las cuales se prefiere una región constante kappa.

Con el objeto de generar un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL pueden unirse operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de modo que las secuencias VH y VL se expresen como una proteína de una sola cadena continua, donde las regiones VL y VH estarán unidas entre sí a través de dicho conector flexible (véanse Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554).

Es posible aislar dominios VH y VL individuales con afinidades de unión como se describió con anterioridad a partir de bibliotecas de dominios individuales, de acuerdo con los métodos descritos con anterioridad. Dos cadenas de dominios VH individuales (con o sin CH1), dos cadenas VL, o un par de una cadena VH y una cadena VL con la afinidad de unión deseada, pueden ser útiles como se describe en la presente documentación para los anticuerpos de la invención.

Con el fin de expresar los anticuerpos recombinantes o las porciones de anticuerpos de la invención, los ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o completas pueden insertarse en vectores de expresión, para unir operativamente los genes a secuencias de control de la transcripción y la traducción apropiadas. En este contexto, el término “unido operativamente” denota que un gen de un anticuerpo está unido en un vector, de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción en el vector cumplen la función que se pretende de ellas, que consiste en regular la transcripción y la traducción del gen de dicho anticuerpo.

En la práctica, el vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de modo que sean compatibles con la célula huésped usada para la expresión. El gen para la cadena ligera del anticuerpo y el gen para la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados, o ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión, donde este último es el caso más común. Los genes de los anticuerpos se insertan en el vector de expresión por medio de métodos convencionales (por ejemplo, uniendo sitios de corte y empalme de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o uniendo extremos romos si no hay sitios de corte y empalme de restricción presentes). El vector de expresión ya puede contener secuencias de regiones constantes de anticuerpos antes de insertar las secuencias de las cadenas ligera y pesada. Por ejemplo, un enfoque consiste en convertir las secuencias VH y VL en genes de anticuerpos completos insertándolas en vectores de expresión que ya contienen las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, respectivamente, con lo que se une operativamente el segmento VH con el o los segmentos CH en el vector, y también se une operativamente el segmento VL con el segmento CL en el vector.

Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de la célula huésped. El gen de dicha cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector, con lo que se une el péptido señal en el mismo marco con el extremo N del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína distinta de inmunoglobulina). Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión de la invención pueden tener secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped.

El término “secuencia reguladora” incluye promotores, potenciadores y otros elementos para controlar la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Las secuencias reguladoras de este tipo se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Aquel entrenado en la técnica ha de apreciar que el diseño del vector de expresión que incluye la selección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped para transformar, la fuerza deseada para la expresión de la proteína, etcétera. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que resultan en una expresión fuerte y constitutiva de las proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador del CMV), el virus de simio 40 (SV40) (tales como el promotor/potenciador del SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor mayor tardío de adenovirus (AdMLP)) y poliomias. Para hallar una descripción más detallada de los elementos reguladores virales y sus secuencias, véanse, por ejemplo, documentos US 5168062, de Stinski, US 4510245, de Bell *et al.*, y US 4968615, de Schaffner *et al.*

Aparte de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden tener secuencias adicionales, tales como las que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. Los genes marcadores de selección facilitan la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU N° 4399216, 4634665 y 5179017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, es común que el gen marcador de selección le confiera resistencia a drogas citotóxicas, tales como G418, higromicina o metotrexato, a la célula huésped en la que se ha insertado el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped dhfr<sup>-</sup> con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418).

Para expresar las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican dichas cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped por medio de técnicas convencionales. Se entiende que las diversas formas del término “transfección” comprenden una multiplicidad de técnicas de uso común para introducir ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y semejantes. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariontas o eucariotas, es preferible expresar los anticuerpos en células eucariotas y, en particular, en células huésped de mamíferos, ya que la probabilidad de que se ensamble y se secrete un anticuerpo plegado correctamente y con actividad inmunológica es mayor en dichas células eucariotas, y

en particular en células de mamíferos, que en las células eucariotas. Se ha informado que la expresión de genes de anticuerpos en procariotas no es efectiva para producir rendimientos elevados de anticuerpos activos (Boss, M.A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

- 5 Las células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo las células CHO dhfr<sup>-</sup> descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, que se usan en combinación con un marcador de selección DHFR, como se describe, por ejemplo, en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2.
- 10 Cuando se introducen los vectores de expresión recombinantes que contienen genes que codifican el anticuerpo en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped hasta que el anticuerpo se expresa en dichas células huésped o, preferiblemente, el anticuerpo se secreta en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Después, los anticuerpos pueden aislarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.
- 15 Del mismo modo, es posible usar células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Por supuesto, en la invención se incluyen variaciones del procedimiento descrito con anterioridad. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la invención. Si hay una cadena ligera o una cadena pesada que no es necesaria para la unión al antígeno de interés, puede eliminarse parcial o completamente el ADN
- 20 que codifica dicha cadena ligera o dicha pesada usando tecnología de ADN recombinante. Del mismo modo, las moléculas expresadas por dichas moléculas de ADN truncadas se incluyen en los anticuerpos de la invención. Además, es posible producir anticuerpos bifuncionales, en los que una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo de la invención, y la otra cadena pesada y la otra cadena ligera tienen especificidad por un antígeno diferente del antígeno de interés, por medio de la reticulación de un anticuerpo de la invención con un segundo
- 25 anticuerpo, por medio de métodos químicos convencionales.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de este, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO dhfr<sup>-</sup> a través de una transfección mediada por

30 fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están unidos operativamente en cada caso a elementos reguladores, que consisten en el potenciador de CMV y el promotor AdMLP, con el fin de producir una transcripción fuerte de dichos genes. El vector de expresión recombinante también contiene un gen DHFR, que puede usarse para seleccionar las células CHO dhfr<sup>-</sup> transfectadas con el vector usando una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas

35 seleccionadas se cultivan de modo que se expresen las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y el anticuerpo intacto se aísla del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar dichas células huésped y obtener el anticuerpo del medio de cultivo. Por ende, la invención se relaciona con un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención, cultivando una célula huésped de la invención en un medio de

40 cultivo apropiado hasta que se ha sintetizado un anticuerpo recombinante de la invención. Además, el método puede comprender aislar dicho anticuerpo recombinante de dicho medio de cultivo.

Como alternativa al análisis de las bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la presentación de fagos, pueden usarse otros métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica en el análisis de bibliotecas de

45 combinación grandes para identificar los anticuerpos de la invención. Básicamente, puede usarse cualquier sistema de expresión en el que se establezca un enlace físico cercano entre un ácido nucleico y el anticuerpo codificado por él para seleccionar una secuencia de ácido nucleico apropiada, en virtud de las propiedades del anticuerpo que codifica.

50 En un tipo de sistema de expresión alternativo, la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa en forma de fusiones de ARN-proteínas, como se describe en WO 98/31700, de Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, la traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que contienen puromicina en su extremo 3', un antibiótico aceptor de peptidilo, genera una fusión covalente de un ARNm y el péptido o la proteína codificada por él. Por lo tanto, es posible concentrar un ARNm

55 específico de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca de combinación) sobre la base de las propiedades del péptido o la proteína codificada (por ejemplo, el anticuerpo o una porción de este), tales como la unión de dicho anticuerpo o la porción de este al globulímero Aβ(20-42) o un derivado de este. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de estos, y que se obtienen analizando estas bibliotecas, pueden expresarse en forma recombinante de la manera descrita con anterioridad (por ejemplo, en células huésped

60 de mamífero), y además, pueden someterse a otra maduración por afinidad por un análisis en procedimientos adicionales de fusiones de ARNm-péptidos, introducción de mutaciones en las secuencias seleccionadas originalmente, o uso de otros métodos de maduración de anticuerpos recombinantes por afinidad *in vitro* de la manera descrita con anterioridad.

65

Combinaciones de enfoques *in vivo* e *in vitro*

- Del mismo modo, los anticuerpos de la invención pueden producirse usando una combinación de enfoques *in vivo* e *in vitro*, tales como los métodos en los que primero se permite que el globulímero A $\beta$ (20-42), o un derivado de este, actúe con un repertorio de anticuerpos en un animal huésped *in vivo*, para estimular la producción de anticuerpos que se unen al globulímero A $\beta$ (20-42) o sus derivados, y luego se realiza la selección del anticuerpo y/o la maduración del anticuerpo (es decir, la optimización) adicional con la ayuda de una o más técnicas *in vitro*. De acuerdo con una realización, un método combinado de este tipo puede comprender primero inmunizar un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camélido, una oveja o una cabra, o una versión transgénica de estos, o un ratón quimérico) con dicho globulímero A $\beta$ (20-42) o un derivado de este para estimular una respuesta al antígeno en forma de anticuerpos, y luego preparar una biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos usando secuencias de inmunoglobulina de linfocitos que han sido estimulados *in vivo* por la acción de dicho globulímero A $\beta$ (20-42) o su derivado. El primer paso de este procedimiento combinado puede efectuarse de la manera descrita con anterioridad en conexión con los enfoques *in vivo*, mientras que el segundo paso de este procedimiento puede llevarse a cabo de la manera descrita con anterioridad en conexión con los enfoques *in vitro*. Los métodos preferidos para inmunizar animales no humanos, con el análisis subsiguiente de las bibliotecas de presentación en fagos preparadas a partir de dichos linfocitos estimulados, incluyen aquellos descritos por BioSite Inc; véanse, por ejemplo, documentos WO 98/47343, WO 91/17271, US 5427908 y US 5580717.
- De acuerdo con otra realización, un método combinado comprende primero inmunizar un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camélido, una oveja o una cabra, o una versión de estos sometida a knockout y/o transgénica, o un ratón quimérico) con un globulímero A $\beta$ (20-42) de la invención o un derivado de este para estimular una respuesta en forma de anticuerpos a dicho globulímero A $\beta$ (20-42) o su derivado, y seleccionar los linfocitos que producen los anticuerpos que tienen la especificidad deseada analizando los hibridomas (preparados, por ejemplo, a partir de animales inmunizados). Los genes de los anticuerpos o los anticuerpos con un solo dominio se aíslan a partir de los clones seleccionados (con métodos de clonación convencionales, tales como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), y se someten a una maduración por afinidad *in vitro* para mejorar las propiedades de unión del anticuerpo seleccionado o los anticuerpos seleccionados. El primer paso de este procedimiento puede llevarse a cabo de la manera descrita con anterioridad en conexión con los enfoques *in vivo*, mientras que el segundo paso de este procedimiento puede llevarse a cabo de la manera descrita con anterioridad en conexión con los enfoques *in vitro*, en particular, usando métodos de maduración por afinidad *in vitro*, tales como los descritos en los documentos WO 97/29131 y WO 00/56772.
- En otro método combinado, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individuales aislados usando un procedimiento que es conocido por aquellos entrenados en la técnica, tal como métodos de selección de linfocitos con anticuerpos (SLAM), que se describe en los documentos US 5627052, WO 92/02551 y Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. En este método, primero se inmuniza un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camélido, una oveja o una cabra, o una versión transgénica de estos, o un ratón quimérico) *in vivo* con dicho globulímero A $\beta$ (20-42) o un derivado de este para estimular una respuesta inmune a dicho oligómero o derivado, y luego se seleccionan las células individuales que secretan los anticuerpos de interés usando un ensayo hemolítico en placa específico para el antígeno. Con este fin, el globulímero o el derivado de este, o moléculas de interés relacionadas desde el punto de vista estructural, puede unirse a eritrocitos de oveja, usando un conector tal como biotina, con lo que se posibilita la identificación de las células individuales que secretan anticuerpos con una especificidad apropiada usando el ensayo hemolítico en placa. Una vez identificadas las células que secretan los anticuerpos de interés, se obtienen ADNc de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de las células por PCR con transcriptasa inversa, y dichas regiones variables pueden expresarse posteriormente en combinación con regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas) en células huésped de mamíferos, tales como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo* pueden someterse posteriormente a análisis *in vitro* y selección *in vitro* adicionales, por ejemplo, dispersando las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos con la afinidad de unión. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden someterse a manipulaciones adicionales *in vitro*.
- Los anticuerpos que tienen las afinidades requeridas definidas en la presente documentación pueden seleccionarse realizando un análisis de transferencia puntual, esencialmente como se describió con anterioridad. Brevemente, el antígeno se une a una matriz sólida, preferiblemente se transfiere a una membrana de nitrocelulosa, en diluciones en serie. Después, el antígeno inmovilizado se pone en contacto con el anticuerpo de interés, a lo que sigue la detección de este último por medio de un anticuerpo secundario conjugado a una enzima y una reacción colorimétrica; con concentraciones definidas de anticuerpo y antígeno, donde la cantidad de anticuerpo unido permite determinar la afinidad. Por consiguiente, la afinidad relativa de dos anticuerpos diferentes por una diana, o de un anticuerpo por dos dianas diferentes, se define en la presente documentación como la relación de las cantidades respectivas de anticuerpo unido a la diana observadas con las dos combinaciones de anticuerpo-diana, bajo condiciones de transferencia puntual que son idénticas en el resto de los aspectos.
- Los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 o 3B10 pueden obtenerse de una manera conocida per se.

Del mismo modo que los anticuerpos pueden competir, como se describió con anterioridad, en la presente documentación se dice que distintas estructuras diana "compiten" por un anticuerpo particular si al menos una de estas estructuras puede reducir específicamente la unión mensurable de la otra, preferiblemente al ofrecer un epítopo superpuesto o idéntico, más preferiblemente un epítopo idéntico.

5 Las entidades diana competitivas son útiles para seleccionar anticuerpos en virtud de su afinidad relativa por estas estructuras diana. Por ende, las afinidades relativas pueden determinarse directamente usando un ensayo competitivo en el que se ponen en contacto formas distinguibles de las entidades competitivas, por ejemplo, entidades competitivas con marcas diferentes, con el anticuerpo de interés, y se deduce la afinidad relativa del anticuerpo por cada una de estas entidades a partir de las cantidades relativas de estas entidades que están unidas al anticuerpo.

15 Este ensayo de competición puede usarse para incrementar directamente el contenido de anticuerpos que poseen una afinidad relativa deseada por la entidad diana, mediante la unión de la entidad por la cual se desea una mayor afinidad a una matriz sólida de soporte, y la adición al medio de una cantidad apropiada, preferiblemente un exceso molar, de la entidad competitiva por la cual se desea una menor afinidad. Por lo tanto, los anticuerpos que presenten las afinidades relativas deseadas tenderán a unirse a la matriz con mayor fuerza que los otros, y podrán obtenerse después de eliminar las formas menos deseables por lavado, por ejemplo, mediante un lavado con concentraciones de sal baja, seguido por la cosecha del anticuerpo unido al desprenderlo de forma reversible de su diana con concentraciones de sal elevadas. Si se desea, pueden llevarse a cabo varios procedimientos de enriquecimiento. En una realización particular de la invención, cuando el genotipo subyacente de un anticuerpo está conectado físicamente a este anticuerpo, por ejemplo, en un conjunto de hibridomas, fagos que presentan antígenos o células de levadura, puede rescatarse el fenotipo correspondiente.

25 En otra realización de la invención se usa una transferencia puntual modificada, donde el antígeno inmovilizado compite por la unión al anticuerpo con una entidad disuelta, de modo que la afinidad relativa del anticuerpo puede deducirse a partir del porcentaje unido al antígeno inmovilizado.

30 Es posible producir porciones de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, a partir de anticuerpos completos, usando procedimientos convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina. Además, los anticuerpos, las porciones de los anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

35 La presente invención también se relaciona con agentes farmacéuticos (composiciones) que comprenden un anticuerpo de la invención y, opcionalmente, un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención contienen al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad que puede ser aliviada con los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, si el anticuerpo de la invención se une a un globulímero de la invención, la composición farmacéutica puede contener además uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para el tratamiento de trastornos donde la actividad de dicho globulímero es importante.

45 Los vehículos aceptables para el uso farmacéutico incluyen solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y para retardar la absorción, y semejantes, siempre que sean compatibles con el medio fisiológico. Los vehículos aceptables para el uso farmacéutico incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y semejantes, y combinaciones de estos. En muchos casos, es preferible usar agentes isotónicos adicionales, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, o cloruro de sodio. Además, los vehículos aceptables para el uso farmacéutico pueden contener cantidades relativamente pequeñas de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, preservantes o tampones, que incrementan la vida media o la eficacia de los anticuerpos.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden ser apropiadas para la administración parenteral, por ejemplo. En este caso, los anticuerpos preferiblemente se preparan como soluciones inyectables con un contenido de anticuerpo de 0,1-250 mg/ml. Las soluciones inyectables pueden prepararse en una forma líquida o liofilizada, donde la forma de dosificación es una cápsula o un recipiente de vidrio, una ampolla o una jeringa rellena. El tampón puede contener L-histidina (1-50 mM, preferiblemente 5-10 mM) y puede tener un pH de 5,0-7,0, preferiblemente 6,0. Otros tampones apropiados incluyen, sin limitaciones, tampones de succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Es posible usar cloruro de sodio para ajustar la tonicidad de la solución hasta una concentración de 0-300 mM (preferiblemente 150 mM para una forma de dosificación líquida). También pueden incluirse crioprotectores, por ejemplo, sacarosa (por ejemplo, 0-10 %, preferiblemente 0,5-1,0 %) para una forma de dosificación liofilizada. Otros crioprotectores apropiados son la trehalosa y la lactosa. También pueden incluirse rellenos, por ejemplo, manitol (por ejemplo, 1-10 %, preferiblemente 2-4 %) para una forma de dosificación liofilizada. Es posible usar estabilizadores, por ejemplo L-metionina (por ejemplo, 51-50 mM, preferiblemente 5-10 mM) en las formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas. Otros rellenos apropiados son la glicina y la arginina. También pueden usarse agentes tensioactivos, por ejemplo, polisorbato 80 (por ejemplo, 0-0,05 %, preferiblemente 0,005-0,01 %). Otros agentes tensioactivos son el polisorbato 20 y los agentes tensioactivos BRIJ.

Las composiciones de la invención pueden tomar una multiplicidad de formas. Estas incluyen formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del tipo de administración y la aplicación terapéutica deseada. Típicamente, es preferible administrar las composiciones en forma de soluciones inyectables o para infusión, por ejemplo, composiciones que son similares a otros anticuerpos para la inmunización pasiva de seres humanos. La ruta de administración preferida es la parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. De acuerdo con otra realización preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de preparación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como soluciones, microemulsiones, dispersiones, liposomas u otras estructuras ordenadas, apropiadas para contener concentraciones elevadas de la sustancia activa. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse introduciendo el compuesto activo (es decir, el anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado, según sea apropiado, con uno o una combinación de los ingredientes mencionados con anterioridad, de ser necesarios, y luego realizando una filtración estéril de dicha solución. Las dispersiones comúnmente se preparan introduciendo el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico, y según sea apropiado, otros ingredientes necesarios. En el caso de un polvo liofilizado estéril para preparar soluciones inyectables estériles, el secado al vacío y el secado por pulverización son métodos de preparación preferidos, que resultan en un polvo del ingrediente activo y, cuando sea apropiado, de otros ingredientes deseados provenientes de una solución previamente sometida a una filtración estéril. La viscosidad correcta de una solución puede mantenerse usando, por ejemplo, un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo, en el caso de las dispersiones, el tamaño de partícula necesario, o usando agentes tensioactivos. Es posible obtener la absorción prolongada de las composiciones inyectables introduciendo adicionalmente en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse a través de una multiplicidad de métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, aunque el tipo preferido de administración para muchas aplicaciones terapéuticas es la inyección subcutánea, la inyección intravenosa o la infusión. Aquellos entrenados en la técnica han de apreciar que la ruta y/o el tipo de administración dependen del resultado deseado. De acuerdo con realizaciones particulares, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protege el compuesto contra la liberación rápida, tal como, por ejemplo, una formulación de liberación sostenida o controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles degradables en un medio biológico, tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para preparar estas formulaciones son bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica; véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

De acuerdo con realizaciones particulares, un anticuerpo de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, en un diluyente inerte o un vehículo metabolizable comestible. El anticuerpo (y otros ingredientes, de ser necesarios) también puede incluirse en cápsulas de gelatina duras o blandas, puede comprimirse en comprimidos o agregarse directamente en el alimento. Para la administración terapéutica oral, los anticuerpos pueden mezclarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos orales, comprimidos bucales, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes y semejantes. Si se desea administrar un anticuerpo de la invención a través de una ruta distinta de la parenteral, puede ser necesario elegir un recubrimiento de un material que evite su inactivación.

La presente invención también se relaciona con un método para inhibir la actividad de los globulómeros de la invención en un individuo que sufre un trastorno en el que participa la proteína  $\beta$  amiloide, y en el que, en particular, la actividad de dichos globulómeros de la invención es importante. Dicho método comprende la administración de al menos un anticuerpo de la invención al individuo, con el objeto de inhibir la actividad del globulómero al cual se une el anticuerpo. Dicho individuo preferiblemente es un ser humano. Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un individuo humano con propósitos terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano para propósitos veterinarios, o dentro del marco de un modelo animal de un trastorno particular. Estos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, para evaluar las dosificaciones y los cronogramas de administración).

Los trastornos donde participan los globulómeros de la invención incluyen en particular trastornos en cuyo desarrollo y/o progresión participa un globulómero de la invención. Estos son en particular aquellos trastornos en los que los globulómeros de la invención son evidente o presumiblemente responsables de la patofisiología de dicho trastorno, o son un factor que contribuye al desarrollo y/o la progresión de dicho trastorno. Por ende, en la presente documentación se incluyen aquellos trastornos en los que la inhibición de la actividad de los globulómeros de la invención puede aliviar los síntomas y/o la progresión del trastorno. Estos trastornos pueden verificarse, por ejemplo, a partir de una concentración incrementada de los globulómeros de la invención en un fluido biológico de un individuo que sufre un trastorno particular (por ejemplo, una concentración incrementada en suero, plasma, CSF, orina, etcétera). Esto puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo de la invención. Los globulómeros de la



invención tienen una participación importante en la patología asociada con una multiplicidad de trastornos en los que hay elementos neurodegenerativos, deficiencias cognitivas, elementos neurotóxicos y elementos inflamatorios.

En otro aspecto de la invención, los trastornos que pueden tratarse o prevenirse incluyen aquellos asociados con la amiloidosis. En la presente documentación, el término "amiloidosis" hace referencia a una cantidad de trastornos caracterizados por el plegamiento, la agrupación, la agregación y/o la acumulación anormal de proteínas particulares (amiloides, proteínas fibrosas y sus precursores) en diversos tejidos del cuerpo. En la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down se ve afectado el tejido nervioso, y en la angiopatía amiloide cerebral (CAA) se ven afectados los vasos sanguíneos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" o una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención. En la presente documentación, una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" hace referencia a una cantidad efectiva, en dosificaciones y por períodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado terapéutico deseado. Aquellos entrenados en la técnica pueden determinar qué constituye una cantidad eficaz para el uso terapéutico del anticuerpo o la porción de anticuerpo, donde dicha cantidad puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o la porción de anticuerpo de provocar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico también es una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o la porción de anticuerpo son sobrepasados por los efectos beneficiosos para la terapia. Una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" hace referencia a una cantidad efectiva, en dosificaciones y por períodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad eficaz para el uso terapéutico será menor que cantidad eficaz para el uso terapéutico.

Más aún, en la presente invención se incluye otro método para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que necesita dicha prevención o tratamiento. Este método comprende el paso de administrarle la vacuna indicada con anterioridad al paciente, en una cantidad suficiente para efectuar la prevención o el tratamiento.

Además, en la presente invención se incluye un método para identificar compuestos apropiados para la inmunización activa de un paciente del que se predice que desarrollará una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Este método comprende 1) exponer uno o más compuestos de interés a uno o más de los anticuerpos descritos con anterioridad, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para que uno o más compuestos se unan a uno o más anticuerpos; 2) identificar aquellos compuestos que se unieron a uno o más anticuerpos, donde los compuestos identificados pueden usarse en la inmunización activa en un paciente del que se predice que desarrollará una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

Dentro del marco del uso de los anticuerpos para diagnóstico, la determinación cualitativa o cuantitativa específica del globulímero sirve en particular para diagnosticar formas del péptido amiloide  $\beta$  relevantes para enfermedades. En este contexto, la especificidad hace referencia a la posibilidad de detectar un globulímero particular, un derivado de este o una mezcla de este con una sensibilidad suficiente. Ventajosamente, los anticuerpos de la invención tienen concentraciones umbrales de detección menores que 10 ng/ml de muestra, preferiblemente menores que 1 ng/ml de muestra, y en particular preferiblemente menores que 100 pg/ml de muestra, lo que significa que con los anticuerpos de la invención puede detectarse al menos la concentración de globulímero por ml de muestra, indicada en cada caso, y ventajosamente también pueden detectarse concentraciones más bajas.

La detección se realiza por medios inmunológicos. En principio, esto puede realizarse usando cualquier método de ensayo de análisis o diagnóstico en el que se usen anticuerpos, incluyendo técnicas de aglutinación y precipitación, inmunoensayos, métodos inmunohistoquímicos y técnicas de inmunotransferencia, por ejemplo, transferencia de Western o, preferiblemente, métodos de transferencia puntual. En la presente documentación también se incluyen los métodos *in vivo*, por ejemplo, métodos de diagnóstico por imágenes.

El uso en inmunoensayos es ventajoso. Son apropiados los inmunoensayos competitivos, es decir, los ensayos donde el antígeno y el antígeno marcado (marcador) compiten por la unión al anticuerpo, y los inmunoensayos en sándwich, es decir, los ensayos donde la unión de anticuerpos específicos con el antígeno se detecta con un segundo anticuerpo, comúnmente marcado. Estos ensayos pueden ser homogéneos, es decir, sin la separación en fases sólidas y líquidas, o heterogéneos, es decir, las marcas unidas se separan de las no unidas, por ejemplo, con anticuerpos unidos a una fase sólida. Dependiendo de la marca y el método de medición, los diversos formatos heterogéneos y homogéneos de los inmunoensayos pueden separarse en clases particulares, por ejemplo RIA (radioinmunoensayos), ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas), FIA (inmunoensayos de fluorescencia), LIA (inmunoensayos de luminiscencia), TRFIA (FIA con resolución temporal), IMAC (inmunoactivación), EMIT (prueba inmune multiplicada con enzimas), TIA (inmunoensayo turbidométrico), I-PCR (inmuno-PCR).

Para cuantificar el globulímero de la invención, se prefieren los inmunoensayos competitivos en los que una cantidad definida de un derivado de globulímero marcado, que sirve como marcador, compite con el globulímero de la muestra (que contiene una cantidad desconocida de globulímeros no marcados) en la que se desea cuantificar la

unión al anticuerpo usado. La cantidad de antígeno, es decir, la cantidad de globulímero, en la muestra puede determinarse a partir de la cantidad de marcador desplazado con la ayuda de una curva de referencia.

5 De las marcas disponibles para estos propósitos, las enzimas han probado ser ventajosas. Pueden usarse sistemas basados en peroxidasa, en particular, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -D-galactosidasa, por ejemplo. Para estas enzimas hay disponibles sustratos específicos cuya conversión puede monitorearse por medios fotométricos, por ejemplo. Los sistemas de sustratos apropiados están basados en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/tetrazolio de nitroazul (BCIP/NPT), rojo Fast/fosfato de naftol-AS-TS para la fosfatasa alcalina; ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinehidrazona (MBTH) para las peroxidasa; o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido y 4-metilumbelifenil- $\beta$ -D-galactósido (MUG) para la  $\beta$ -D-galactosidasa. En muchos casos, estos sistemas de sustratos están disponibles comercialmente en una forma lista para usar, por ejemplo, en forma de comprimidos que también pueden contener reactivos adicionales, tales como tampones apropiados, y semejantes.

15 Las marcas usadas pueden ser globulímeros marcados. En este sentido, un globulímero particular puede determinarse marcando el globulímero a determinar y usándolo como marcador.

20 La unión de las marcas a los globulímeros para preparar marcadores puede efectuarse de una manera conocida per se. Pueden realizarse comentarios análogos a los anteriores sobre la derivatización de los globulímeros de la invención. Además, hay una cantidad de marcas disponibles que están modificadas apropiadamente para la conjugación con proteínas, por ejemplo, enzimas conjugadas con biotina, avidina, extravidina o estreptavidina, enzimas activadas con maleimida, y semejantes. Estas marcas pueden hacerse reaccionar con el oligómero, o de ser necesario, con el globulímero derivatizado apropiadamente, para obtener el marcado. Si, por ejemplo, se usa un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, primero es necesario biotinilar el globulímero. Del mismo modo, esto puede aplicarse en el orden inverso. Los métodos apropiados con este propósito también son conocidos por aquellos entrenados en la técnica.

30 Si se selecciona un formato de inmunoensayo heterogéneo, el complejo de antígeno-anticuerpo puede separarse uniéndolo al soporte, por ejemplo, con un anticuerpo anti-idiotípico unido a dicho soporte, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra IgG de conejo. Los soportes apropiados, en particular, las placas de microtitulación recubiertas con anticuerpos apropiados, son conocidos, y algunos se hallan disponibles comercialmente.

35 Además, la presente invención se relaciona con conjuntos de inmunoensayo que tienen al menos un anticuerpo como se describió con anterioridad, y otros componentes. Dichos conjuntos comúnmente toman la forma de una unidad envasada, una combinación de medios para poner en práctica la determinación del globulímero de la invención. Con el objeto de facilitar la manipulación en la mayor medida posible, dichos medios preferiblemente se proporcionan en una forma esencialmente lista para usar. En una disposición ventajosa, se ofrece el inmunoensayo en forma de conjunto de elementos. Un conjunto de elementos comúnmente comprende varios recipientes para colocar los distintos componentes separados. Todos los componentes pueden proporcionarse en una dilución lista para usar, como un concentrado para diluir o como una sustancia seca o un liofilizado para disolver o suspender; los componentes individuales o combinados pueden congelarse o almacenarse a temperatura ambiente hasta usarlos. Los sueros preferiblemente se congelan de forma instantánea, por ejemplo, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , de modo que, en estos casos, es necesario mantener el inmunoensayo preferiblemente a temperaturas inferiores al punto de congelamiento hasta usarlos.

50 Otros componentes incluidos en el inmunoensayo dependen del tipo de dicho inmunoensayo. Comúnmente se proporcionan proteínas de referencia, pueden necesitarse o no marcadores, y puede haber un suero control junto con el antisuero. Además, pueden incluirse placas de microtitulación, preferiblemente placas recubiertas con anticuerpos, tampones, por ejemplo, para la evaluación, el lavado o la conversión del sustrato, y el sustrato para la enzima en sí mismo.

55 Los principios generales de los inmunoensayos y la generación y el uso de los anticuerpos como auxiliares en laboratorios y hospitales pueden hallarse, por ejemplo, en *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow, E., y Lane, D., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

60 Por lo tanto, en la presente invención también se incluye un método para diagnosticar una amiloidosis, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, en un paciente sospechoso de padecer esta enfermedad. Este método comprende los siguientes pasos: 1) aislar una muestra biológica del paciente; 2) poner en contacto la muestra biológica con al menos uno de los anticuerpos descritos con anterioridad, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos de antígeno/anticuerpo; y 3) detectar la presencia de los complejos de antígeno/anticuerpo en dicha muestra, donde la presencia de los complejos indica el diagnóstico de una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, en el paciente. El antígeno puede ser, por ejemplo, un globulímero o una porción o un fragmento de este que tiene las mismas propiedades funcionales que el globulímero completo (por ejemplo, actividad de unión).

65

Adicionalmente, en la presente invención se incluye otro método para diagnosticar una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, en un paciente sospechoso de padecer esta enfermedad. Este método comprende los siguientes pasos: 1) aislar una muestra biológica del paciente; 2) poner en contacto la muestra biológica con un antígeno, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos de antígeno/anticuerpo; 3) agregar un conjugado a los complejos de antígeno/anticuerpo resultantes, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir la unión del conjugado al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende uno de los anticuerpos descritos con anterioridad, unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y 4) detectar la presencia de un anticuerpo que puede estar presente en la muestra biológica mediante la detección de una señal generada por el compuesto generador de señal, donde la señal indica el diagnóstico de una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, en el paciente. El antígeno puede ser un globulímero o una porción o un fragmento de este que tiene las mismas propiedades funcionales que el globulímero completo (por ejemplo, actividad de unión).

En la presente invención se incluye un método adicional para diagnosticar una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, en un paciente sospechoso de padecer una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Este método comprende los siguientes pasos: 1) aislar una muestra biológica de dicho paciente; 2) poner en contacto la muestra con un anti-anticuerpo, donde el anti-anticuerpo es específico para uno de los anticuerpos descritos con anterioridad, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir la formación de complejos anti-anticuerpo/anticuerpo, donde los complejos que contienen el anticuerpo están presentes en la muestra biológica; 2) agregar un conjugado para obtener complejos anti-anticuerpo/anticuerpo, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende un antígeno que se une a un compuesto generador de señal que es capaz de generar una señal detectable; y 3) detectar la señal generada por el compuesto generador de señal, donde la señal indica un diagnóstico de amiloidosis, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, en el paciente.

También, en la presente invención se incluye un conjunto de elementos que comprende: a) al menos uno de los anticuerpos descritos con anterioridad y b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal, donde el anticuerpo del conjugado es diferente del anticuerpo aislado.

En la presente invención también se incluye un conjunto de elementos que comprende: a) un anti-anticuerpo contra uno de los anticuerpos descritos con anterioridad y b) un conjugado que comprende un antígeno unido a un compuesto generador de señal. El antígeno puede ser un globulímero o un fragmento o una porción de este que tiene las mismas características funcionales que el globulímero (por ejemplo, actividad de unión).

En una realización de diagnóstico de la presente invención, un anticuerpo de la presente invención, o una porción de este, se aplica sobre una fase sólida (o está presente en una fase líquida). La prueba o la muestra biológica (por ejemplo, sangre completa, fluido cefalorraquídeo, suero, etcétera) se ponen en contacto posteriormente con la fase sólida. Si el antígeno (por ejemplo, el globulímero) está presente en la muestra, dicho antígeno se une a los anticuerpos en la fase sólida, y luego es detectado con un método directo o indirecto. El método directo comprende simplemente detectar la presencia del complejo mismo, y por lo tanto, la presencia de antígenos. En el método indirecto, se agrega un conjugado al antígeno unido. El conjugado comprende un segundo anticuerpo que se une al antígeno unido, unido a un compuesto generador de señal o una marca. Si el segundo anticuerpo se une al antígeno unido, el compuesto generador de señal genera una señal medible. Después, esta señal indica la presencia del antígeno en la muestra de prueba.

Los ejemplos de fases sólidas usadas en los inmunoensayos de diagnóstico son los materiales porosos y no porosos, las partículas de látex, las partículas magnéticas, las micropartículas (véase la Patente de los EEUU N° 5705330), las esferas, las membranas, las placas de microtitulación y los tubos plásticos. La elección del material de la fase sólida y el método para marcar el antígeno o el anticuerpo presente en el conjugado, si se desea, se determina sobre la base de las características de desempeño deseadas para el formato de ensayo.

Como se indicó con anterioridad, el conjugado (o el reactivo indicador) comprenderá un anticuerpo (o tal vez, el anti-anticuerpo, dependiendo del ensayo) unido a un compuesto generador de señal o una marca. Este compuesto generador de señal o "marca" es detectable o puede hacerse reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable. Los ejemplos de compuestos generadores de señales incluyen cromógenos, radioisótopos (por ejemplo, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S y <sup>14</sup>C), compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, acridinio), partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes formadores de complejos, o catalizadores, tales como enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso de una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante), la adición de un sustrato cromo, fluoro o lumogénico resulta en la generación de una señal detectable. También son útiles otros sistemas de detección, tales como la fluorescencia con resolución temporal, la fluorescencia de reflexión interna, la amplificación (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa) y la espectroscopia de Raman.

Los ejemplos de fluidos biológicos que pueden evaluarse en los inmunoensayos anteriores incluyen plasma, sangre completa, sangre completa deshidratada, suero, fluido cefalorraquídeo o extractos acuosos o no acuosos de tejidos y células.

La presente invención también abarca un método para detectar la presencia de anticuerpos en una muestra de prueba. Este método comprende los siguientes pasos: (a) poner en contacto la muestra sospechosa de contener los anticuerpos con un anti-anticuerpo específico para los anticuerpos en la muestra del paciente, por un período de tiempo y bajo condiciones suficiente para permitir la formación de complejos de anti-anticuerpo/anticuerpo, donde el anti-anticuerpo es un anticuerpo de la presente invención que se une a un anticuerpo en la muestra del paciente; (b) agregar un conjugado a los complejos de anti-anticuerpo/anticuerpo resultantes, donde el conjugado comprende un antígeno (que se une al anti-anticuerpo) unido a un compuesto generador de señal con el que puede detectarse una señal detectable; y (d) detectar la presencia de los anticuerpos que pueden estar presentes en la muestra de prueba por medio de la detección de la señal generada por el compuesto generador de señal. Puede usarse un control o calibrador que comprende un anticuerpo contra el anti-anticuerpo.

Dentro del alcance de la invención también se incluyen conjuntos de elementos. Más específicamente, en la presente invención se incluyen conjuntos de elementos para determinar la presencia de antígenos (por ejemplo, globulímeros) en un paciente sospechoso de padecer la enfermedad de Alzheimer u otra afección caracterizada por una alteración cognitiva. En particular, un conjunto de elementos para determinar la presencia de antígenos en una muestra de prueba comprende a) un anticuerpo como se define en la presente documentación, o una porción de este; y b) un conjugado que comprende un segundo anticuerpo (que presenta especificidad por el antígeno) unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. El conjunto de elementos también puede contener un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno.

En la presente invención también se incluye un conjunto de elementos para detectar anticuerpos en una muestra de prueba. El conjunto de elementos puede comprender a) un anti-anticuerpo específico (por ejemplo, uno del sujeto invención) para el anticuerpo de interés y b) un antígeno o una porción de este, como se definió con anterioridad. También puede incluirse un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno. Más específicamente, el conjunto de elementos puede comprender a) un anti-anticuerpo (tal como uno de la presente invención) específico para el anticuerpo y b) un conjugado que comprende un antígeno (por ejemplo, un globulímero) unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. Nuevamente, el conjunto de elementos también puede comprender un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno.

El conjunto de elementos también puede comprender un recipiente, tal como un tubo, una botella o una cinta, donde cada uno de estos recipientes contiene una fase sólida preparada, y otros recipientes que contienen los conjugados respectivos. Estos conjuntos de elementos también pueden contener recipientes o envases para los otros reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo, tales como reactivos de lavado, procesamiento e indicadores.

También se debe destacar que en la presente invención no solamente se incluyen los anticuerpos completos descritos con anterioridad, sino también porciones o fragmentos de estos, por ejemplo, su porción Fab. Adicionalmente, la presente invención abarca cualquier anticuerpo que tiene las mismas propiedades de los presentes anticuerpos en términos, por ejemplo, de especificidad de unión, estructura, etcétera.

**Ventajas de la invención:**

Al realizar la inmunización con el globulímero A $\beta$ (20-42), pueden obtenerse distintos anticuerpos monoclonales que difieren en su tolerancia o su capacidad de reconocimiento de distintos oligómeros A $\beta$ (1-42) y oligómeros A $\beta$ (X-42), lo que se determina por transferencia puntual comparativa, como se describió con anterioridad. Esto permite desarrollar un anticuerpo dirigido a oligómeros A $\beta$  con cortes N-terminales que poseen una relación óptima entre el efecto potenciador de la cognición, la especificidad deseada sobre otras formas de A $\beta$  y el bajo perfil de efectos colaterales. Sorprendente, los globulímeros A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (12-42), a pesar de contener el elemento estructural, solamente son reconocidos parcialmente por los anticuerpos obtenidos cuando se usa el globulímero A $\beta$ (20-42) cortado como antígeno.

Al restringir la forma oligomérica específica de A $\beta$  al principio estructural básico (es decir, el uso de globulímeros A $\beta$  con cortes N-terminales), se genera un perfil de anticuerpos en la inmunización activa que es muy específico para las formas oligoméricas de A $\beta$ . Lo mismo es válido para los anticuerpos monoclonales que han de usarse en la inmunización pasiva. La ventaja de esta estrategia específica para la inmunización (activa y pasiva) es que no inducirá una respuesta inmune contra los monómeros A $\beta$ , los péptidos A $\beta$  en estados de agregación fibrilar o sAPP $\alpha$ . Esto es ventajoso en diversos aspectos:

- 1) En forma de placas A $\beta$  insolubles, los péptidos A $\beta$  en estados de agregación fibrilar dan cuenta de la mayor parte del conjunto completo de péptidos A $\beta$  en los cerebros con AD. Una liberación masiva de A $\beta$  debida a la disolución de las placas A $\beta$ , inducida por la reacción de anticuerpos anti-A $\beta$  anticuerpos con estas placas, puede considerarse perjudicial. Esta liberación masiva de A $\beta$  cruzaría posteriormente la barrera hematoencefálica, ingresaría en el torrente sanguíneo e incrementaría potencialmente el riesgo de microhemorragias. Además, en la prueba ELAN, esta misma estrategia de inmunización con formas fibrilares del péptido A $\beta$  motivó la cancelación de la prueba, debido a que 6 % de los casos presentaron un inicio temprano de meningoencefalitis.

2) Las respuestas inmunes dirigidas a las formas monoméricas del péptido A $\beta$  son indeseables, ya que fue posible demostrar que estas últimas pueden ejercer efectos que potencian la cognición.

3) Del mismo modo, las respuestas inmunes dirigidas a sAPP $\alpha$  también son indeseables, ya que esto puede resultar en una reacción con la proteína precursora de ocurrencia fisiológica APP y, por lo tanto, en una reacción autoinmune. Más aún, también se demostró que sAPP $\alpha$  ejerce efectos que potencian la cognición.

4) Es necesario evitar una respuesta dirigida a péptido A $\beta$  vascular en forma de CAA, con el fin de evitar efectos colaterales indeseables en forma de microhemorragias (anticuerpos contra la porción central de A $\beta$ , y que además no se unen a los péptidos A $\beta$  agregados en forma de CAA, inducen menos microhemorragias en comparación con aquellos contra el extremo N, véase la descripción anterior).

5) Los anticuerpos que reaccionen específicamente con los oligómeros A $\beta$  tendrán una mayor biodisponibilidad con relación a las especies de A $\beta$  relevantes desde el punto de vista patofisiológico, ya que no se unirán, por ejemplo, al A $\beta$  fibrilar, por lo que no estarán disponibles para el efecto terapéutico.

Información de depósito: El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 5F7 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, el 1 de Diciembre de 2005, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7241. Además, el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 10F11 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 1 de Diciembre de 2005, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7239. Adicionalmente, el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 4B7 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 1 de Diciembre de 2005, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7242, y el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 7C6 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 1 de Diciembre de 2005, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7240. Adicionalmente, el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 6A2 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 28 de Febrero de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7409, y el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 2F2 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 28 de Febrero de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7408. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 4D10 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 28 de Febrero de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7405. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 7E5 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 16 de Agosto de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7809. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 10C1 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 16 de Agosto de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7810. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 3B10 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 1 de Septiembre de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7851. Todos los depósitos se realizaron a nombre de Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064 (EEUU).

Descripción de los dibujos:

En la Figura 1 se ilustran cromatogramas de exclusión por tamaño de A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (1-40). El monómero A $\beta$ (1-42) fue disuelto en A) 0,1 % de NH<sub>4</sub>OH, B) 70 % de ácido fórmico, C) 0,1 % de NaOH, y en D), A $\beta$  (1-40) se disolvió en 0,1 % de NaOH. Después, las muestras se diluyeron 1:10 en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Después de disolverlas a temperatura ambiente, las muestras se incubaron por 5 minutos (columna izquierda) o 1 hora (columna derecha), y luego se aplicaron a la columna de exclusión de tamaño;

en la Figura 2 A) se ilustra un SDS PAGE de proteínas de referencia (marcadores moleculares proteicos, carril 1); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42); control (carril 2); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) + mAb 5F7, 20 horas, 37 °C, sobrenadante (carril 3); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) + mAb 5F7, 20 horas, 37 °C, precipitado (carril 4); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) + mAb 6E10, 20 horas, 37 °C, sobrenadante (carril 5); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) + mAb 6E10, 20 horas, 37 °C, precipitado (carril 6); B) se ilustran los resultados del análisis cuantitativo de mAb unidos a fibrillas A $\beta$ , expresados como porcentaje de anticuerpo total;

la Figura 3 es un diagrama de barras donde se ilustran los resultados de la prueba de reconocimiento de objetos con ratones transgénicos APP/L tras una inmunización activa con monómeros A $\beta$ (1-42) en 0,1 % de NH<sub>4</sub>OH, globulómeros A $\beta$ (1-42) y globulómeros A $\beta$ (20-42), en comparación con ratones tipo silvestre (control positivo) y ratones APP/L tratados con PBS (control negativo), donde los círculos indican diferencias significativas respecto de los ratones APP/L tratados con

PBS, y los asteriscos indican diferencias altamente significativas con relación al nivel de azar (50 %), de acuerdo con pruebas t post-hoc después de  $P < 0,05$  en un ANOVA para las diferencias entre los grupos;

- 5 en la Figura 4 se ilustran transferencias puntuales de la reactividad de 100 pmol/μl (fila A); 10 pmol/μl (fila B); 1 pmol/μl (fila C); 0,1 pmol/μl (fila D) y 0,01 pmol/μl (fila E) de globulómero Aβ(1-42) (columna 1); de monómero Aβ(1-42) pretratado con HFIP en Pluronic F68 (columna 2); de globulómero Aβ(20-42) (columna 3); de globulómero Aβ(12-42) (columna 4); de monómero Aβ(1-40) pretratado con HFIP en DMSO (columna 5); de monómero Aβ(1-42), NH<sub>4</sub>OH (columna 6); de una preparación de fibrillas Aβ(1-42) (columna 7); y de sAPPα de Sigma (columna 8), con diversos antisueros obtenidos después de una inmunización activa de ratones transgénicos APP/L con globulómero Aβ(20-42);
- 10
- 15 la Figura 5 es un diagrama de barras donde se ilustran las concentraciones de péptidos Aβ(1-42) y Aβ(1-40) solubles e insolubles en extractos del cerebro de ratones transgénicos APP/PS1 sometidos a inmunización activa, ya sea con monómero Aβ(1-42) (0,1 % de NH<sub>4</sub>OH), globulómero Aβ(1-42), globulómero Aβ(20-42) o un vehículo como control;
- 20 la Figura 6 es un diagrama de barras donde se ilustran los resultados de la prueba de reconocimiento de objetos con ratones transgénicos APP/L, después de una inmunización pasiva con los anticuerpos anti-globulómero Aβ(20-42) 5F7, 10F11 y 7C6, en comparación con los ratones control para A) cada anticuerpo por separado y B) todos los anticuerpos juntos;
- 25 en la Figura 7 A) se ilustra un análisis de transferencia puntual de la especificidad de distintos anticuerpos anti-Aβ (-6E10, -5F7, -4B7, -10F11, -6A2, -4D10, -3B10, -2F2, -7C6, -7E5, -10C1). Los anticuerpos monoclonales evaluados en este caso se obtuvieron por medio de la inmunización activa de ratones con globulómero Aβ(20-42), a lo que siguió la selección de células de hibridomas (con la excepción de 6E10, Signet N° 9320, disponible comercialmente). Las formas individuales de Aβ fueron aplicadas en diluciones en serie e incubadas con los anticuerpos monoclonales respectivos para la reacción inmune:
- 30
1. monómero Aβ(1-42), 0,1 % de NH<sub>4</sub>OH
  2. monómero Aβ(1-40), 0,1 % de NH<sub>4</sub>OH
  3. monómero Aβ(1-42), 0,1 % de NaOH
  4. monómero Aβ(1-40), 0,1 % de NaOH
  5. globulómero Aβ(1-42)
  6. globulómero Aβ(12-42)
  7. globulómero Aβ(20-42)
  8. preparación de fibrillas Aβ(1-42)
  9. sAPPα (Sigma) (primer punto: 1 pmol)
- 35
- 40
- 45
- 50 B) La evaluación cuantitativa fue realizada utilizando un análisis densitométrico de la intensidad. Para cada forma Aβ, se evaluó únicamente el punto correspondiente a la concentración de antígeno más baja, siempre que tuviera una densidad relativa mayor a 20 % de la densidad relativa del último punto de globulómero Aβ(20-42) (umbral) identificado de forma óptica sin ambigüedades. Este valor umbral se determinó para cada transferencia puntual de manera independiente. El valor indica la relación entre el reconocimiento de globulómero Aβ(20-42) y la forma Aβ respectiva para el anticuerpo dado;
- 55
- 60 en la Figura 8 se ilustra la unión de los anticuerpos en distintas concentraciones, con secciones transversales de las neocortezas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (AD), o ratones transgénicos APP viejos:
- 65
- A) La verificación mediante la coloración con rojo Congo de depósitos amiloides como placas en tejido cerebral y como angiopatía amiloide cerebral (CAA), en vasos del cerebro de ratones transgénicos APP de la línea Tg2576 y en un paciente con AD (RZ55).
- B) La coloración fuerte de depósitos parenquimáticos de Aβ (placas amiloides) en un paciente con AD (RZ16) ocurre solamente con 6G1 y el anticuerpo 6E10, disponible comercialmente

(columna izquierda); mientras que los anticuerpos 5F7, 2F2 y 6A2 (segunda columna), 4D10, 10F11 y 3B10 (tercera columna) y 7C6, 7E5 y 10C1 (columna derecha) no presentan coloración alguna. Todos los anticuerpos fueron utilizados en una concentración de 0,7 µg/ml;

C) La coloración fuerte de los depósitos parenquimáticos de Aβ (placas amiloides) en ratones Tg2576 de 19 meses de edad ocurre únicamente con 6G1 y el anticuerpo 6E10, disponible comercialmente (columna izquierda); mientras que los anticuerpos 5F7, 2F2 y 6A2 (segunda columna), 4D10, 10F11 y 3B10 (tercera columna) y 7C6, 7E5 y 10C1 (columna derecha) no presentan coloración alguna. Todos los anticuerpos fueron utilizados en una concentración de 0.7 µg/ml;

D)-G) Cuantificación del análisis de la coloración de la placa Aβ en las imágenes histológicas usando análisis de imágenes. Los valores de densidad óptica (0 % = sin coloración) fueron calculados a partir de la escala de valores de escala de grises en placas, a los que se les sustrajeron los valores de escala de grises del tejido de fondo: D) coloración con 0,7 µg/ml de anticuerpo en ratones Tg2576 viejos, E) coloración con 3 concentraciones diferentes de anticuerpos en ratones APP/L, F) coloración con 0,7 µg/ml de anticuerpo en un paciente con AD (RZ55), y G) coloración con 3 niveles diferentes de concentraciones de anticuerpos en un paciente con AD (RZ16). Las diferencias de coloración entre los anticuerpos 6E10 (asteriscos), y 4G8 (círculos) disponibles comercialmente, y todos los otros anticuerpos (tres asteriscos/círculos: p<0,001 versus control; prueba t post-hoc de Bonferroni después de un ANOVA con p<0,001) se sometieron a una evaluación estadística (D, F). En E) y G), todos los anticuerpos, con excepción de 6G1, siempre presentaron una coloración significativamente menor que los anticuerpos 6E10 y 4G8 disponibles comercialmente (p<0,001 en una prueba t post-hoc después de p<0,001 en el ANOVA).

H) La coloración fuerte de los depósitos vasculares de Aβ (flechas) ocurre únicamente con 6G1 y el anticuerpo 6E10, disponible comercialmente (columna izquierda); mientras que los anticuerpos 5F7, 2F2 y 6A2 (segunda columna), 4D10, 10F11 y 3B10 (tercera columna) y 7C6, 7E5 y 10C1 (columna derecha) no presentan coloración alguna. Todos los anticuerpos fueron utilizados en una concentración de 0,7 µg/ml. Se halló una situación cualitativa similar en el ratón Tg2576 (no indicado aquí);

Figura 9

titulaciones del anticuerpo anti-Aβ y del perfil de selectividad de la transferencia puntual en plasma de ratones TG2576, aproximadamente un año después de la inmunización activa. En las pruebas en plasma de ratón Tg2576, aproximadamente un año después de la inmunización con A) globulómero Aβ (20-42), B) globulómero Aβ (12-42), C) monómero Aβ (1-42) y D) vehículo, se evaluaron los anticuerpos anti-Aβ producidos y aún presentes por transferencia puntual.

1. globulómero Aβ (1-42)
2. monómero Aβ (1-42), pretratado con HFIP, en 0,1 % de Pluronic F68
3. globulómero Aβ (20-42)
4. globulómero Aβ (12-42)
5. monómero Aβ (1-40), pretratado con HFIP, 5mM en DMSO
6. monómero Aβ (1-42), 0,1 % de NH4OH
7. preparación de fibrillas Aβ (1-42)
8. sAPPα (Sigma); (primer punto: 1pmol);

en la Figura 10

se ilustra una tabla donde se resumen los niveles de globulómero Aβ(20-42) en tejido cerebral de seres humanos que tienen la enfermedad de Alzheimer y en un control sin demencia;

en la Figura 11

se ilustran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas variables pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales (mAb) que se indican a continuación (en cada secuencia de aminoácidos se subrayan las regiones de determinación de la complementariedad (CDR)):

Fig. 11	SEC ID N°	Tipo de secuencia	Cadena	mAb
A1	1	nucleótidos	Variable pesada (VH)	5F7
A2	2	nucleótidos	Variable ligera (VL)	5F7
A1	3	aminoácidos	Variable pesada (VH)	5F7
A2	4	aminoácidos	Variable ligera (VL)	5F7
B1	5	nucleótidos	Variable pesada (VH)	10F11
B2	6	nucleótidos	Variable ligera (VL)	10F11
B1	7	aminoácidos	Variable pesada (VH)	10F11
B2	8	aminoácidos	Variable ligera (VL)	10F11
C1	9	nucleótidos	Variable pesada (VH)	7C6
C2	10	nucleótidos	Variable ligera (VL)	7C6

Fig. 11	SEC ID N°	Tipo de secuencia	Cadena	mAb
C1	11	aminoácidos	Variable pesada (VH)	7C6
C2	12	aminoácidos	Variable ligera (VL)	7C6
D1	13	nucleótidos	Variable pesada (VH)	4B7
D2	14	nucleótidos	Variable ligera (VL)	4B7
D1	15	aminoácidos	Variable pesada (VH)	4B7
D2	16	aminoácidos	Variable ligera (VL)	4B7
E1	17	nucleótidos	Variable pesada (VH)	2F2
E2	18	nucleótidos	Variable ligera (VL)	2F2
E1	19	aminoácidos	Variable pesada (VH)	2F2
E2	20	aminoácidos	Variable ligera (VL)	2F2
F1	21	nucleótidos	Variable pesada (VH)	6A2
F2	22	nucleótidos	Variable ligera (VL)	6A2
F1	23	aminoácidos	Variable pesada (VH)	6A2
F2	24	aminoácidos	Variable ligera (VL)	6A2
G1	25	nucleótidos	Variable pesada (VH)	4D10
G2	26	nucleótidos	Variable ligera (VL)	4D10
G1	27	aminoácidos	Variable pesada (VH)	4D10
G2	28	aminoácidos	Variable ligera (VL)	4D10
H1	29	nucleótidos	Variable pesada (VH)	7E5
H2	30	nucleótidos	Variable ligera (VL)	7E5
H1	31	aminoácidos	Variable pesada (VH)	7E5
H2	32	aminoácidos	Variable ligera (VL)	7E5
I1	33	nucleótidos	Variable pesada (VH)	10C1
I2	34	nucleótidos	Variable ligera (VL)	10C1
I1	35	aminoácidos	Variable pesada (VH)	10C1
I2	36	aminoácidos	Variable ligera (VL)	10C1
J1	37	nucleótidos	Variable pesada (VH)	3B10
J1	38	aminoácidos	Variable pesada (VH)	3B10

Los siguientes ejemplos tienen como intención ilustrar la invención sin limitar su alcance.

#### Ejemplo 1: Preparación de globulómeros

5

##### a) Globulómero A $\beta$ (1-42)

El péptido sintético A $\beta$ (1-42) (H-1368, Bachem, Bubendorf, Suiza) se suspendió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) al 100 % a razón de 6 mg/ml y se incubó hasta su completa solubilización con agitación a 37 °C durante 1,5 horas. El HFIP actúa rompiendo los enlaces hidrógeno, y se usa para eliminar las heterogeneidades estructurales preexistentes en el péptido A $\beta$ . El HFIP se eliminó por evaporación en un dispositivo SpeedVac, y el A $\beta$ (1-42) se resuspendió a una concentración de 5 mM en dimetilsulfóxido y se sonicó durante 20 segundos. El A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) hasta 400  $\mu$ M, y se agregaron 1/10 volúmenes de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2 % (en H<sub>2</sub>O) (concentración final de 0,2 % de SDS). Una incubación durante 6 horas a 37 °C dio como resultado el globulómero intermedio A $\beta$ (1-42) de 16/20-kDa (forma corta del oligómero globular). El globulómero A $\beta$ (1-42) de 38/48-kDa se generó mediante una dilución adicional con tres volúmenes de H<sub>2</sub>O y una incubación durante 18 horas a 37 °C. Después de una centrifugación a 3000 g durante 20 minutos, la muestra se concentró por ultrafiltración (punto de corte: 30 kDa), se dializó contra NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante que comprendía el globulómero A $\beta$ (1-42) de 38/48-kDa. Como una alternativa a la diálisis, también puede precipitarse el globulómero A $\beta$ (1-42) 38/48-kDa con un exceso de nueve veces (v/v) de solución metanol/ácido acético helada (33 % de metanol, 4 % de ácido acético) durante 1 hora a 4 °C. Después se precipitó el globulómero A $\beta$ (1-42) de 38/48-kDa por centrifugación (10 minutos a 16200 g), se resuspendió en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, y se ajustó el pH en 7,4.

25

##### b) Globulómero reticulado A $\beta$ (1-42)

El péptido sintético A $\beta$ (1-42) (H-1368, Bachem, Bubendorf, Suiza) se suspendió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) al 100 % a razón de 6 mg/ml y se incubó hasta su completa solubilización con agitación a 37 °C durante 1,5 horas. El HFIP actúa rompiendo los puentes de hidrógeno, y se lo usó para eliminar las heterogeneidades estructurales preexistentes en el péptido A $\beta$ . El HFIP se eliminó por evaporación en un dispositivo SpeedVac, y el A $\beta$ (1-42) se resuspendió a una concentración de 5 mM en dimetilsulfóxido y se sonicó durante 20 segundos. El A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) hasta 400  $\mu$ M, y se agregaron 1/10 volúmenes de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2 % (en H<sub>2</sub>O) (con una concentración final de 0,2 % de SDS). Una incubación durante 6 horas a 37 °C dio como resultado el

35



5 globulómero intermediario A $\beta$ (1-42) de 16/20-kDa (forma corta del oligómero globular). El globulómero A $\beta$ (1-42) de 38/48-kDa se generó mediante una dilución adicional con tres volúmenes de H<sub>2</sub>O y una incubación durante 18 horas a 37 °C. Después se realizó la reticulación del globulómero A $\beta$ (1-42) de 38/48-kDa mediante una incubación con glutaraldehído 1 mM durante 2 horas a temperatura ambiente de 21 °C (TA), a lo que siguió un tratamiento con etanolamina (5 mM) durante 30 minutos a TA.

c) Globulómero A $\beta$ (20-42)

10 Se mezclaron 1,59 ml de la preparación de globulómero A $\beta$ (1-42), preparado de acuerdo con el ejemplo 1a, con 38 ml de tampón (MES/NaOH 50 mM, pH 7,4) y 200  $\mu$ l de una solución de 1 mg/ml de termolisina (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 20 horas. Luego se agregaron 80  $\mu$ l de una solución de EDTA 100 mM, pH 7,4, en agua, y además, el contenido de SDS de la mezcla se ajustó en 0,01 % con 400  $\mu$ l de una solución de SDS con una concentración de 1 %. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente 1 ml con un tubo Centriprep de 30 kDa de 15 ml. El concentrado se mezcló con 9 ml de tampón (MES/NaOH 50 mM, 0,02 % de SDS, pH 7,4) y se concentró nuevamente hasta 1 ml. El concentrado se dializó a 6 °C contra 1 l de tampón (fosfato de sodio 5 mM, NaCl 35 mM) en un tubo de diálisis durante 16 horas. Se ajustó el contenido del dializado en 0,1 % con una solución de SDS con una concentración de 2 % en agua. La muestra se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos y se separó el sobrenadante, es decir, el globulómero A $\beta$ (20-42).

20 d) Globulómero A $\beta$ (12-42)

25 Se mezclaron 2 ml de una preparación de globulómero A $\beta$ (1-42), preparada de acuerdo con el ejemplo 1a, con 38 ml de tampón (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 35 mM, pH 7,4) y 150  $\mu$ l de endoproteinasa GluC a razón de 1 mg/ml (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a TA, y posteriormente se agregaron 150  $\mu$ l adicionales de endoproteinasa GluC 1 mg/ml (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó a TA durante otras 16 horas, a lo que siguió el agregado de 8  $\mu$ l de una solución 5 M de DIFP. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente 1 ml por medio de un tubo Centriprep de 30 kDa de 15 ml. El concentrado se mezcló con 9 ml de tampón (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 35 mM, pH 7,4) y se concentró nuevamente hasta 1 ml. El concentrado se dializó a 6 °C contra 1 l de tampón (fosfato de sodio 5 mM, NaCl 35 mM) en un tubo de diálisis durante 16 horas. Se ajustó el contenido de SDS del dializado en 0,1 % con una solución de SDS con una concentración de 1 % en agua. La muestra se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos y se separó el sobrenadante globulómero A $\beta$ (12-42).

35 Ejemplo 2: Cromatografía de exclusión molecular de diferentes preparaciones de monómero A $\beta$ (1-42) y monómero A $\beta$ (1-40)

A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %:

40 Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem, N° de catálogo H-1368) en 500  $\mu$ l de NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O, y se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

45 Muestra de 5 minutos:

Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante que contenía NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, hasta una concentración de A $\beta$ (1-42) de 0,2 mg/ml. La muestra se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

50 Muestra de 1 hora:

Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante que contenía NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, a una concentración de A $\beta$ (1-42) de 0,2 mg/ml. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

55 A $\beta$ (1-42), HCOOH al 70 %:

60 Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) en 50  $\mu$ l de HCOOH al 70 % en H<sub>2</sub>O y se agitó 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

Muestra de 5 minutos:

65 Se diluyeron 2  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en HCOOH al 70 % a una concentración de 0,2 mg/ml de A $\beta$ (1-42) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, y se ajustó a pH 7,4 con NaOH 1 M. La muestra se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

Muestra de 1 hora:

5 Se diluyeron 2  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en HCOOH al 70 % a una concentración de 0,2 mg/ml de A $\beta$ (1-42) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, y se ajustó a pH 7,4 con NaOH 1 M. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

A $\beta$ (1-42), NaOH al 0,1 %:

10 Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem, N° de catálogo H-1368) en 500  $\mu$ l de NaOH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O, y se agitó 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

Muestra de 5 minutos:

15 Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en NaOH al 0,1 % a una concentración de 0,2 mg/ml de A $\beta$ (1-42) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La muestra se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

20 Muestra de 1 hora:

Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en NaOH al 0,1 % a una concentración de 0,2 mg/ml de A $\beta$ (1-42) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

25 A $\beta$ (1-40), NaOH al 0,1 %:

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-40) (Bachem, N° de catálogo H-1194) en 500  $\mu$ l de NaOH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O, y se agitó 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

Muestra de 5 minutos:

35 Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-40) en NaOH al 0,1 % a una concentración de 0,2 mg/ml A $\beta$ (1-40) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La muestra se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

Muestra de 1 hora:

40 Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-40) en NaOH al 0,1 % a una concentración de 0,2 mg/ml de A $\beta$ (1-40) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

45 Condiciones para cromatografía de exclusión molecular (SEC):

Columna de SEC: Superose 12 HR 10/300 GL (Amersham, N° de catálogo 17-5173-01)

Flujo: 0,5 ml/minuto

Velocidad del papel: 0,2 cm/minuto

50 Extinción a 214 nm: 0-0,2 unidades de absorbancia

Fase móvil: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

Los resultados se ilustran en la Figura 1.

55 La preparación de una solución pura de A $\beta$  monomérico es un gran desafío, debido a la elevada tendencia del péptido A $\beta$ , especialmente el monómero A $\beta$ (1-42), a agregarse en fibrillas. Sin embargo, para el análisis y la caracterización de anti-globulómeros A $\beta$ (20-42) que discriminen monómeros A $\beta$ (1-42) y monómeros A $\beta$ (1-40), es necesario usar la mejor preparación monomérica de A $\beta$  que pueda obtenerse con los medios técnicos disponibles. En este caso se evaluó el efecto del solvente inicial del péptido A $\beta$  sobre el efecto de agregación, después de una dilución adicional en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. El proveedor del péptido A $\beta$  (Bachem) afirma en la información técnica que A $\beta$ (1-42) ha de solubilizarse en NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %. Cinco minutos a temperatura ambiente (TA) después de solubilizar el A $\beta$ (1-42) en NH<sub>4</sub>OH y una dilución adicional inmediata 1:10 en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 en la cromatografía de exclusión molecular se observan las primeras señales de agregación de A $\beta$ (1-42) a precursores fibrilares con un pico menor a 74 kD. El A $\beta$ (1-42) monomérico corre con un pico mayor de 11 kD y un hombro a 6 kD. Después de incubar el péptido A $\beta$ (1-42) en NH<sub>4</sub>OH durante una hora a temperatura ambiente (TA), ya se ha agregado en mayor extensión a fibrillas de A $\beta$ (1-42), lo que resulta en una pérdida de

material detectable que no ingresa en la columna de cromatografía de exclusión molecular. Si se usa ácido fórmico al 70 % como solvente inicial para el péptido Aβ(1-42), se produce un mayor grado de agregación después de 1 hora a TA con solamente una menor fracción de monómero Aβ(1-42) libre (obsérvese que el ácido fórmico por sí solo lleva a una mayor absorción de fondo a la longitud de onda de detección de proteínas). El mejor solvente inicial para Aβ(1-42) para prevenir la agregación es NaOH al 0,1 %, que incluso después de 1 hora de incubación de solubilización y dilución adicional, solamente presenta una pequeña fracción de Aβ(1-42) agregado, y la mayor parte de Aβ(1-42) aún se halla como monómero. El Aβ(1-40) solubilizado inicialmente en NaOH al 0,1 % no presenta signo de agregación alguno, incluso después de 1 hora de incubación a TA.

10 Ejemplo 3: Análisis semicuantitativo visualizado por SDS-PAGE de la discriminación de anticuerpos selectivos de globulímero Aβ(20-42) para fibrillas Aβ(1-42)

Preparación fibrilar Aβ(1-42):

15 Se disolvió 1 mg de Aβ(1-42) (Bachem, N° de cat. H-1368) en 500 µl de NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O, y se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de Aβ(1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

20 Se mezclaron 100 µl de Aβ(1-42) en NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % con 300 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, y se ajustó a pH 7,4 con HCl al 2 %. Luego se incubó la muestra a 37 °C durante 20 horas. Después, la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g. El sobrenadante se descartó, y el resto se mezcló con 400 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, se resuspendió con agitación vigorosa ("agitación vorticial") durante 1 minuto, y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g. El sobrenadante se descartó, y el resto se mezcló con 400 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, se resuspendió por agitación vigorosa ("agitación vorticial") durante 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g una vez más. El sobrenadante se descartó. El resto se resuspendió en 380 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 y se ayudó con agitación vigorosa ("agitación vorticial").

Unión de los anticuerpos anti-Aβ a fibrillas Aβ(1-42):

30 Se diluyeron 40 µl de preparación fibrilar Aβ(1-42) con 160 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4, y se agitó 5 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 10000 g. El sobrenadante se descartó, y el resto se resuspendió en 95 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,05 % Tween 20, pH 7,4. La resuspensión se realizó por agitación vigorosa ("agitación vorticial").

Se mezclaron alícuotas de 10 µl de la preparación fibrilar cada una con:

- a) 10 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4
- b) 10 µl de 0,5 µg/µl de 5F7 en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4
- c) 10 µl de 0,5 µg/µl de 6E10 (Signet N° 9320) en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

Las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 horas, luego se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 g.

Los sobrenadantes se recolectaron y se mezclaron con 20 µl de solución de muestra SDS-PAGE. Los restos se mezclaron con 50 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,025 % Tween 20, pH 7,4 y se resuspendieron por "agitación vorticial", luego se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 10000 g. Los sobrenadantes se descartaron, y los restos se mezclaron con 20 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,025 % Tween 20, pH 7,4, luego con 20 µl de solución de muestra SDS-PAGE. Las muestras se sembraron en un gel 4 - 20 % Tris/Glicina para electroforesis.

Parámetros para SDS-PAGE:

Solución de muestra SDS: 0,3 g de SDS  
4 ml Tris/HCl 1 M, pH 6,8  
8 ml de glicerina  
1 ml de azul de bromofenol al 1 % en etanol  
Llevado a 50 ml con H<sub>2</sub>O

Gel 4-20 % Tris/Glicina: (Invitrogen, N° de cat. EC6025BOX)

Tampón de electroforesis: 7,5 g de Tris  
36 g de glicina  
2,5 g de SDS  
Llevado a 2,5 l con H<sub>2</sub>O

El gel se analiza a una corriente constante de 20 mA.  
Coloración de los geles: Azul de Coomassie R250

Los resultados se ilustran en la Figura 2.

5 Análisis semicuantitativo de diferentes anticuerpos anti-A $\beta$  y su discriminación de fibrillas A $\beta$ (1-42). Las posiciones de los anticuerpos, fibrillas A $\beta$ (1-42) y monómeros A $\beta$ (1-42) están marcadas en el borde del gel. Debido a su tamaño, las fibrillas A $\beta$ (1-42) no pueden ingresar en el gel SDS-PAGE, y se pueden observar en el pocillo del gel.

- 10 1. Marcador  
2. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); control  
3. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); + mAb 5F7; 20 horas a 37 °C; sobrenadante  
4. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); + mAb 5F7; 20 horas a 37 °C; precipitado  
15 5. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); + mAb 6E10; 20 horas a 37 °C; sobrenadante  
6. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); + mAb 6E10; 20 horas a 37 °C; precipitado

La unión relativa a las fibrillas tipo A $\beta$  se evaluó con un análisis de SDS-PAGE, midiendo los valores de Densidad Óptica (DO) de las cadenas pesadas de los anticuerpos en la unión fibrilar (fracción precipitado) y las fracciones de sobrenadante después de la centrifugación. Los anticuerpos que se unieron a las fibrillas A $\beta$  deberían coprecipitar con las fibrillas A $\beta$ , y por lo tanto, se encuentran en la fracción precipitada, mientras que los anticuerpos no unidos a fibrillas A $\beta$  (libres) se encuentran en el sobrenadante. El porcentaje de anticuerpo unido a fibrillas A $\beta$  se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

25 **Porcentaje de anticuerpo unido a fibrillas A $\beta$  =  $DO_{\text{fracción fibrilar}} \times 100 \% / (DO_{\text{fracción fibrilar}} + DO_{\text{fracción sobrenadante}})$ .**

Este procedimiento se realizó para los mAb 6E10 (Signet, N° de cat. 9320), 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1.

30 En un cerebro con la enfermedad de Alzheimer, las fibrillas A $\beta$  son uno de los componentes principales del conjunto de péptido A $\beta$  total. Al atacar estas fibrillas con anticuerpos anti A $\beta$ , el riesgo de efectos secundarios negativos es elevado, debido a la liberación de grandes cantidades de A $\beta$ , que luego puede incrementar el riesgo de microhemorragias. Se observó un incremento en el riesgo de microhemorragias en un sistema de inmunización activa con agregados fibrilares del péptido A $\beta$  (Bennett y Holtzman, 2005, *Neurology*, 64, 10-12; Orgogozo J, *Neurology*, 2003, 61,46–54; Schenk *et al.*, 2004, *Curr Opin Immunol*, 16, 599–606).

35 A diferencia del anticuerpo disponible en forma comercial 6E10 (Signet 9320), que reconoce un epitopo de A $\beta$  linear entre AA1 y 17, el anticuerpo 5F7 selectivo para el globulómero A $\beta$ (20-42) (que en realidad tiene la menor selectividad por los globulómeros A $\beta$ (20-42) en comparación con las otras formas A $\beta$ ) no se une a las fibrillas A $\beta$ (1-42) en un experimento de coprecipitación. Esto se observa por el hecho de que el anticuerpo 5F7 después de una incubación con fibrillas A $\beta$ (1-42) permanece en el sobrenadante después de un paso de precipitación, y no coprecipita por estar unido a las fibrillas A $\beta$ (1-42).

45 Ejemplo 4: Análisis del comportamiento cognitivo en ratones por medio de un ensayo de reconocimiento de objeto, después de una inmunización activa con monómero A $\beta$ (1-42) (NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %), globulómero A $\beta$ (1-42) o globulómero A $\beta$ (20-42), en comparación con la cepa salvaje

En estos experimentos se usaron ratones con sobreexpresión de APP humano con una mutación puntual. La mutación puntual hace referencia al aminoácido 717 (sustitución de valina por isoleucina), y se ha encontrado en una familia de Londres, donde lleva al inicio de la AD antes del comienzo de la sexta década de vida (Mullan *et al.*, *Nature Genetics* 2 (1992) 340-342). Los ratones transgénicos, denominados APP/L en la presente documentación, fueron creados y descritos por primera vez en Leuven (Moechars *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6483-6492). Los ratones APP/L hembra se sometieron a una inmunización activa a las 6 semanas de edad.

50 Los ratones recibieron 100  $\mu$ g de monómero A $\beta$ (1-42) (NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %), globulómero A $\beta$ (1-42) o globulómero A $\beta$ (20-42) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), mezclado con igual cantidad de coadyuvante de Freund completo en forma intraperitoneal, a lo que siguieron inyecciones de refuerzo con la misma cantidad de antígeno en coadyuvante de Freund incompleto cada tres semanas durante tres meses. Durante el transcurso del experimento, los animales se conservaron bajo condiciones convencionales, con un ciclo día/noche invertido (14 horas de luz comenzando a las 7 pm/10 horas de oscuridad). El aumento en el peso corporal durante el transcurso del experimento fue tal como se esperaba, y no fue significativamente diferente del grupo control, que recibió PBS/coadyuvante solo, lo que sugiere que los tratamientos con antígeno fueron bien tolerados.

55 A los 4,5 meses de edad, se estudió la habilidad cognitiva de los ratones por medio de un ensayo de reconocimiento de objeto descrito en la técnica (Dewachter *et al.*, *Journal of Neuroscience* 22 (2002) 3445-3453). Con este fin, los ratones se acostumbraron a una arena, y luego se expusieron durante 10 minutos a una fase de adquisición, durante la cual se colocaron individualmente en la arena, que ahora contenía dos elementos idénticos (pirámide azul, cubo

verde, cilindro amarillo de tamaño similar, aproximadamente 4 cm). Se registró la duración y la frecuencia con la cual el ratón exploró los objetos. Durante la fase de retención, 2,5 horas más tarde, los ratones se colocaron nuevamente en la arena, que ahora contenía, además de los objetos conocidos, un objeto desconocido seleccionado al azar entre otros objetos. El reconocimiento del nuevo objeto se registró como el tiempo durante el cual el ratón estuvo explorando el objeto antiguo en relación al tiempo total (exploración del objeto antiguo y nuevo). El “índice de reconocimiento” expresa esta relación (tiempo para el nuevo objeto/tiempo total). Un ratón que no recuerda el objeto conocido lo considerará igualmente interesante que el nuevo objeto, y pasará igual cantidad de tiempo explorándolo, en otras palabras, mostrará un índice de reconocimiento de 50 %. Un ratón que recuerda el objeto conocido lo considerará no interesante, y por lo tanto, tendrá un índice de reconocimiento significativamente mayor. Los ratones APP/L son conocidos por ser presentar deficiencias cognitivas a los 4,5 meses de edad y exhibir un índice de reconocimiento en el rango del nivel aleatorio, es decir 50 %.

Los resultados se ilustran en la Figura 3.

15 Prueba de reconocimiento de objeto en ratones. En la prueba se informa del reconocimiento de un objeto conocido en comparación con uno desconocido, medido en términos del comportamiento exploratorio durante una fase de prueba de 10 minutos. El índice de reconocimiento se define como el porcentaje de tiempo que el ratón ocupa explorando un objeto desconocido en relación al tiempo que ocupa explorando ambos objetos. El objeto conocido fue explorado durante una fase de adquisición de 10 minutos, tres horas antes de la fase de prueba. Se compararon 20 cinco grupos de ratones (el número n indicado debajo de las columnas). Los ratones normales C57Bl/6 (cepa salvaje) presentaron un RI elevado significativamente diferente del nivel aleatorio (50 %, es decir, tiempos de exploración iguales transcurridos en ambos objetos, conocido y desconocido) (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ; prueba de Student). Los otros cuatro grupos de ratones transgénicos APP se sometieron a inmunización activa con tres meses de antelación. Los inmunógenos usados fueron el monómero A $\beta$ (1-42), el globulómero A $\beta$ (1-42) y el globulómero A $\beta$ (20-42). Como control se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las diferencias significativas entre el PBS y los otros grupos se indican con círculos: ° =  $p < 0,05$ ; °° =  $p < 0,01$  (prueba de t post-hoc después de  $p < 0,05$  en el ANOVA).

30 Los ratones APP/L son conocidos por presentar, a diferencia de los ratones no transgénicos, una deficiencia cognitiva a los 4,5 meses de edad, y porque alcanzan resultados cercanos al nivel aleatorio (es decir 50 % de índice de reconocimiento). De hecho, los ratones tratados con PBS presentaron un comportamiento aleatorio, a diferencia de los ratones no transgénicos (cepa salvaje). La inmunización con globulómero A $\beta$ (1-42) nativo así como con globulómero A $\beta$ (20-42) dio como resultado un reconocimiento de objeto significativamente mejorado en los ratones APP/L.

35 Debido a que ambas preparaciones de globulómero (nativo y truncado) dieron como resultado una mejora en la memoria de los animales transgénicos APP y un reconocimiento aún mayor en los animales tratados con globulómero A $\beta$ (20-42), es razonable asumir que la inducción de anticuerpos contra el globulómero truncado A $\beta$ (20-42) producirá el mejor resultado, y que la inmunización pasiva con anticuerpos reactivos específicamente con esta especie representa la estrategia de tratamiento óptima.

Ejemplo 5: Análisis por transferencia puntual del perfil de anticuerpos para diferentes formas de A $\beta$  después de una inmunización activa de ratones Tg APP/L con globulómero A $\beta$ (20-42)

45 Después de la inmunización de ratones APP/L (compárese con el ejemplo 4) (Moechars *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274, 6483-6492) con diferentes formas de A $\beta$ , se evaluaron los anticuerpos anti-A $\beta$  en muestras de plasma. Con este fin, se hicieron diluciones en serie de las formas de A $\beta$ (1-42) individuales en un rango entre 100 pmol/ $\mu$ l y 0,01 pmol/ $\mu$ l en PBS suplementado con 0,2 mg/ml de BSA. Se colocó 1  $\mu$ l de cada muestra sobre una membrana de nitrocelulosa. Para la detección se usaron las muestras de plasma de ratón correspondientes (con una dilución de 50 1:400). Se hizo una inmunocoloración con IgG anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina y el reactivo de coloración NBT/BCIP.

Referencias de A $\beta$  para transferencia puntual:

- 55 1. Globulómero A $\beta$ (1-42)  
La preparación del globulómero A $\beta$ (1-42) se describe en el ejemplo 1a.
2. Monómero A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP en Pluronic F68  
Se disolvieron 3 mg de A $\beta$ (1-42), (Bachem Inc.; N° de cat. H-1368) en 0,5 ml de HFIP (suspensión de 6 mg/ml) en un tubo Eppendorf de 1,7 ml y se agitó (mezclador Eppendorf Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37 °C hasta que se obtuvo una solución transparente. La muestra se secó en un concentrador SpeedVac (1,5 h) y se resuspendió en 13,2  $\mu$ l de DMSO, se agitó durante 10 segundos, a lo que siguió una sonicación (20 segundos) y una agitación (por ejemplo en un mezclador Eppendorf Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos. Se agregaron 6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; 0,1 % de Pluronic F68; pH 7,4, y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 3000 g. El sobrenadante se descartó, y el precipitado se disolvió en 0,6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; 1 % de Pluronic F68, pH 7,4. Se agregaron 3,4 ml de

## ES 2 527 661 T3

H<sub>2</sub>O y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, a lo que siguieron 20 minutos de centrifugación a 3000 g. Se almacenaron ocho alícuotas de 0,5 ml del sobrenadante a -20° para su uso posterior.

### 3. Globulómero A $\beta$ (20-42)

5 La preparación del globulómero A $\beta$ (20-42) se describe en el ejemplo 1c.

### 4. Globulómero A $\beta$ (12-42)

La preparación del globulómero A $\beta$ (12-42) se describe en el ejemplo 1d.

### 5. Monómero A $\beta$ (1-40) pretratado con HFIP, 5 mM en DMSO

10 Se resuspendió 1 mg de A $\beta$ (1-40), (Bachem Inc, N° de cat. H-1194) en 0,25 ml de HFIP (suspensión de 4 mg/ml) en un tubo Eppendorf. El tubo se agitó (por ejemplo, en un mezclador Eppendorf Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37 °C para obtener una solución transparente, y luego se secó en un concentrador Speedvac (1,5 horas).  
15 La muestra se disolvió nuevamente en 46  $\mu$ l de DMSO (solución de 21,7 mg/ml = 5 mM), se agitó durante 10 segundos y luego se sonicó durante 20 segundos. Después de 10 minutos de agitación (por ejemplo, en un mezclador Eppendorf Thermo, 1400 rpm), la muestra se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

### 6. Monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %

20 Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O (preparado fresco) (= 2 mg/ml) y se agitó inmediatamente durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

### 7. Fibrillas A $\beta$ (1-42)

25 Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem Inc. Catálogo N°: H-1368) en 500  $\mu$ l de NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % acuoso (tubo Eppendorf) y la muestra se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se neutralizaron 100  $\mu$ l de esta solución preparada fresca A $\beta$ (1-42) con 300  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4. El pH se ajustó a pH 7,4 con HCl al 1 %. La muestra se incubó durante 24 horas a 37 °C y se centrifugó (10 minutos a 10000 g). El sobrenadante se descartó, y el precipitado de fibrillas se suspendió nuevamente con 400  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4, por agitación vorticial durante 1 minuto.

### 8. sAPP $\alpha$

30 Obtenido en Sigma (N° de cat. S9564; 25  $\mu$ g en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). El sAPP $\alpha$  se diluyó con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA a razón de 0,1 mg/ml (= 1 pmol/ $\mu$ l).

35 Materiales para la transferencia puntual:

#### Referencias de A $\beta$ :

Dilución en serie de antígenos A $\beta$  en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4+ 0,2 mg/ml de BSA

- 40 1) 100 pmol/ $\mu$ l  
2) 10 pmol/ $\mu$ l  
3) 1 pmol/ $\mu$ l  
4) 0,1 pmol/ $\mu$ l  
45 5) 0,01 pmol/ $\mu$ l

#### Nitrocelulosa:

Medio Trans-Blot Transfer, Membrana de Nitrocelulosa Pura (0,45  $\mu$ m); BIO-RAD

#### Anti-Ratón-AP:

50 AQ330A (Chemicon)

#### Reactivo de detección:

Comprimidos NBT/BCIP (Roche)

55 Seroalbúmina Bovina, (BSA):

A-7888 (SIGMA)

#### Reactivo de bloqueo:

Leche descremada al 5 % en TBS

60

#### Soluciones de tampón:

TBS

Tampón de Tris/HCl 25 mM, pH 7,5

+ NaCl 150 mM

65

TTBS

Tampón de Tris/HCl 25 mM, pH 7,5  
+ NaCl 150 mM  
+ 0,05 % de Tween 20

5

PBS + 0,2 mg/ml de BSA  
Tampón de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,4  
+ NaCl 140 mM  
+ 0,2 mg/ml BSA

10

Solución de anticuerpo I:

Muestras de plasma de ratón de un estudio de inmunización activa con globulímero A $\beta$ (20-42)  
(dilución 1:400 en 20 ml de leche descremada al 1 % en TBS)

15

Solución de anticuerpo II:

Dilución 1:5000  
Anti-ratón-AP en leche descremada al 1 % en TBS

Procedimiento de transferencia puntual:

20

1) Se colocó 1  $\mu$ l de cada una de las distintas referencias de A $\beta$  (en sus 5 diluciones en serie) en la membrana de nitrocelulosa, con una distancia de aproximadamente 1 cm una de la otra.

25

2) Las gotas de referencias de A $\beta$  se dejaron secar sobre la membrana de nitrocelulosa al aire durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (TA) (= transferencia puntual)

3) Bloqueo:

La transferencia puntual se incubó con 30 ml de leche descremada al 5 % en TBS durante 1,5 horas a TA.

30

4) Lavado:

La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA.

35

5) Solución de anticuerpo I:

Se descartó el tampón de lavado y se incubó la transferencia puntual con solución de anticuerpo I durante la noche a TA.

40

6) Lavado:

La solución de anticuerpo I se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TBS con agitación durante 10 minutos a TA.

45

7) Solución de anticuerpo II:

El tampón de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con solución de anticuerpo II durante 1 hora a TA

50

8) Lavado:

La solución de anticuerpo II se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TBS con agitación durante 10 minutos a TA.

55

9) Revelado:

La solución de lavado se descartó. Se disolvió 1 comprimido de NBT/BCIP en 20 ml de H<sub>2</sub>O y la transferencia puntual se incubó durante 5 minutos con esta solución. El revelado se detuvo por lavado intenso con H<sub>2</sub>O.

60

Los resultados se ilustran en la Figura 4.

65

Análisis de transferencia puntual de los anticuerpos anti-A $\beta$  producidos después de la inmunización activa de ratones con el globulómero A $\beta$ (20-42) para evaluar su especificidad para diferentes formas de A $\beta$ . Se colocaron gotas de las formas individuales de A $\beta$  en diluciones en serie, y se las incubó con el plasma de ratón correspondiente que contenía los anticuerpos anti A $\beta$  producidos durante la reacción inmune. Las transferencias puntuales individuales corresponden a distintos ratones inmunizados individuales.

1. Globulómero A $\beta$ (1-42)
2. Monómero A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP en 0,1 % de Pluronic F68
3. Globulómero A $\beta$ (20-42)
4. Globulómero A $\beta$ (12-42)
5. Monómero A $\beta$ (1-40), pretratado con HFIP, 5 mM en DMSO
6. Monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %
7. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42)
8. sAPP $\alpha$  (Sigma); (primera aplicación: 1 pmol)

En un estudio de inmunización activa de ratones Tg APP/L se demostró que la inmunización con el globulómero A $\beta$ (20-42) lleva al mejor resultado, ya que alivia el deterioro cognitivo en estos ratones en comparación con el tratamiento con PBS. Las muestras de plasma de ratones Tg APP/L sometidos a una inmunización activa con globulómero A $\beta$ (20-42) presentan un perfil de anticuerpos (reconocimiento predominante de globulómero A $\beta$ (20-42) y globulómero A $\beta$ (12-42)) que se asemeja al de los mAb contra el globulómero A $\beta$ (20-42) que se reivindican en la presente documentación.

Ejemplo 6: Concentración de los péptidos A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (1-40) solubles e insolubles en extractos de cerebro de ratones Tg APP/PS1 sometidos a una inmunización activa con monómero A $\beta$ (1-42), globulómero A $\beta$ (1-42), globulómero A $\beta$ (20-42) o vehículo como control

Para este estudio se usaron 40 ratones hembra de un modelo doblemente transgénico de la enfermedad de Alzheimer (ratones Tg APP/PS1), sobre un progenitor FVBxC57Bl/6J, con 4 meses de edad. Los ratones Tg APP/PS1 contienen la forma del aminoácido 695 del APP humano con la mutación V717I (posición con referencia a la isoforma mayor de APP), junto con el gen de Presenilina 1 humana con la mutación A264E. Ambos genes están bajo el control del promotor Thy1. Los ratones se generaron y se caracterizaron en uno de los laboratorios fundadores de reMYND, Grupo de Genética Experimental, Campus Gasthuisberg, Universidad Católica Leuven, por el Prof. Fred Van Leuven *et al.*

Se determinaron los genotipos de todos los ratones por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a la edad de 3 semanas y recibieron un número de identificación único, una vez que se conocieron los resultados de la PCR.

Los ratones tuvieron libre acceso a agua prefiltrada y estéril (lámpara UV) y alimento convencional para ratón. La comida se almacenó bajo condiciones de sequedad y frío en una habitación de almacenaje bien ventilada. La cantidad de agua y comida se verificó a diario, se proveyó cuando fue necesario y, por defecto, se renovó dos veces por semana.

Los ratones se albergaron con un ritmo alternado de día-noche: 14 horas de luz/10 horas de oscuridad comenzando a las 7 p.m., en jaulas de metal convencionales tipo RVS T2 (área de 540 cm<sup>2</sup>). Las jaulas se equiparon con pisos sólidos y una capa de lecho. La cantidad de ratones por jaula fue limitada de acuerdo a la legislación de bienestar animal. Cinco días antes del inicio de la prueba de comportamiento, los ratones fueron cambiados de jaula a jaulas macrolon Tipo 2, y se transportaron al laboratorio con el objeto de adaptarlos a ambiente del laboratorio durante la preparación para la prueba de comportamiento.

Los ratones recibieron 100  $\mu$ g de monómero A $\beta$ (1-42) (NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %), globulómero A $\beta$ (1-42) o globulómero A $\beta$ (20-42) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) mezclada con igual cantidad de coadyuvante de Freund completo en forma intraperitoneal, a lo que siguieron inyecciones de refuerzo con la misma cantidad de antígeno en coadyuvante de Freund incompleto cada 3 semanas durante 4 meses.

#### Bioquímica

Se determinó el A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) en la fracción soluble de 1 hemisferio por ELISA. Además, se determinó A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) por ELISA en la fracción de membrana insoluble de 1 hemisferio.

Los ratones se anestesiaron con una mezcla 2:1:1 de Ketalar (ketamina), Rompun (xilazina 2 %) y atropina, y se sometieron a una descarga transcardíaca con suero fisiológico a 4 °C. Esto se realizó para quitar la sangre de los vasos cerebrales, un procedimiento que no tiene influencia sobre la integridad del órgano. Se recolectó fluido cefalorraquídeo (CSF) a través de una incisión en los músculos del cuello, entre el cráneo y la primera vértebra cervical. Se hizo una punción en la cisterna magna con una aguja de calibre 26 y se recolectaron entre 10 y 20  $\mu$ l de CSF con una pipeta de vidrio fina.



La sangre se recolectó por punción cardíaca y con una jeringa de 1 ml en tubos Eppendorf recubiertos con heparina. La sangre se centrifugó a 14000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. El suero se almacenó a -70 °C.

Los ratones se lavaron en forma intracardíaca con suero fisiológico a 4 °C.

5 El cerebro se extrajo del cráneo, y se separó el cerebelo del cerebro anterior con un corte en el plano coronal/frontal. El cerebelo fue descartado. El cerebro anterior se dividió de manera uniforme en hemisferio izquierdo y derecho por medio de un corte sagital en la línea media.

10 Inmediatamente, se sumergió un hemisferio en nitrógeno líquido y se lo almacenó a -70 °C hasta el análisis bioquímico.

Homogeneización y fraccionamiento de un hemisferio cerebral

15 El cerebro se homogenizó usando un vástago Potter, un tubo de vidrio (libre de detergente, 2 cm<sup>3</sup>) y un homogeneizador mecánico (650 rpm). Como tampón de homogeneización se usó un volumen de 6,5 x ½ peso de cerebro de tampón de Tris/HCl 20 mM (pH 8,5) preparado fresco con inhibidores de proteasas (1 comprimido cada 50 ml de tampón Tris/HCl, Complete™, Roche, Mannheim, Alemania).

20 Las muestras se transfirieron de -70 °C a un soporte de muestras con nitrógeno líquido, y cada muestra individual se precalentó incubándola en el banco durante unos segundos antes de la homogeneización. Los homogeneizados se recolectaron en tubos de centrifuga TLX Beckman y se colocaron en hielo antes de la centrifugación. Entre las dos muestras, el vástago Potter y el tubo de vidrio se lavaron cuidadosamente con agua destilada (AD) sin detergentes, y se secaron con papel absorbente.

25 Las muestras se centrifugaron en una ultracentrifuga preenfriada (Beckman, Mannheim, Alemania) durante 1 hora y 20 minutos a 48000 rpm (135000 x g) a 4 °C. Debido a la cantidad limitada de soportes de centrifuga (N = 8), las muestras se clasificaron en función del peso de cerebro (para equilibrar la centrifuga) y se separaron al azar, con el objetivo de dividir los diferentes grupos de tratamiento en las diferentes sesiones de centrifugación.

30 El sobrenadante (fracción soluble que contiene los péptidos secretados APP y amiloide) se separó del precipitado (fracción de membrana que contiene los fragmentos APP unidos a membrana y los péptidos amiloides asociados a placas en el caso de ratones ancianos). El sobrenadante se dividió en dos tubos, uno de los cuales se almacenó a -20 °C como reserva, y el otro se procesó adicionalmente para cromatografía en columna para concentrar los péptidos amiloides.

35 En la siguiente tabla se indican, a modo de ejemplo, los pesos de los cerebros, el volumen de tampón Tris/HCl usado, las sesiones de centrifugación (marcadas con color) y el volumen de fracción usado para la cromatografía en columna.

40

Nº de Muestra	Tratamiento	Nº ID de ratón	Peso de cerebro (W) (mg)	V Tris (=W x 6,5) (µl)	50 % V Tris (µl)
19	X	TAB.TPF 1305	157,8	1026	513
21	X	TAB.TPF 1335	160,2	1049	521

45 Se montaron columnas de fase invertida pequeñas (cartuchos C18-Sep-Pak Vac 3cc, Waters, Massachusetts, MA) en un sistema de vacío y se las lavó con acetonitrilo al 80 % en ácido trifluoroacético al 0,1 % (A-TFA) seguido por TFA al 0,1 % dos veces. Después, las muestras se aplicaron y las columnas se lavaron sucesivamente con A-TFA al 5 % y 25 %. Los péptidos amiloides se eluyeron con A-TFA al 75 %, y las fracciones eluidas se recolectaron en tubos de 2 ml sobre hielo. Las fracciones eluidas se liofilizaron en un concentrador SpeedVac (Savant, Farmingdale, NY) durante la noche y se disolvieron nuevamente en 330 µl del diluyente de muestra proporcionado con los conjuntos de elementos de ELISA.

50 Adicionalmente, los precipitados se fraccionaron en diferentes fracciones de membrana: la fracción de membrana A (MFA), la fracción de membrana B (MFB), que contenía APP completo, y la fracción de membrana C (MFC), que contenía el amiloide asociado a placas. Por lo tanto, los precipitados se disolvieron en tampón TBS con inhibidores de proteasas (1 comprimido cada 50 ml de tampón TBS, Complete™, Roche, Mannheim, Alemania), y la MFA se dividió en dos tubos, de los cuales uno se almacenó a -20 °C como reserva. 60 % de la MFA se sometió a un procesamiento adicional con el agregado de NP40 (2 % de volumen final) y Triton X-100 (2 % de volumen final) en TBS con inhibidores de proteasas y se centrifugó durante una hora a 27000 rpm (98000 x g) en una ultracentrifuga Beckman a 4 °C usando un rotor oscilante (SW60). El sobrenadante (MFB) se separó del precipitado (MFC), y ambos se almacenaron a -20 °C.

60 En la siguiente tabla se indican, a modo de ejemplo, los pesos de los cerebros, 60 % del peso de cada cerebro, los volúmenes de tampón TBS + PI + NP40 + Triton X-100 usados y las sesiones de centrifugación (marcadas con

colores).

Nº de Muestra	Tratamiento	Nº ID de ratón	Peso de cerebro (W) (mg)	3/5 x Peso de cerebro (mg)	Volumen de tampón = 3/5 W x 15 (µl)
19	X	TAB.TPF 1305	157,8	95	1420
21	X	TAB.TPF 1335	160,2	96	1442

ELISA de A $\beta$  humano en la fracción soluble de un hemisferio

5 Para cuantificar la cantidad de A $\beta$ (1-40) humano y A $\beta$ (1-42) humano en la fracción soluble de los homogeneizados de cerebro y/o en fluido cefalorraquídeo (CSF), se usaron conjuntos de elementos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) disponibles en forma comercial (ELISA de alta sensibilidad h Amyloid  $\beta$ 40 o  $\beta$ 42, The Genetics Company, Zúrich, Suiza). El ELISA se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se prepararon referencias (una dilución de A $\beta$ (1-40) o A $\beta$ (1-42) sintético) y muestras en una placa de polipropileno de 96 pocillos sin la capacidad de unir proteínas (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania). Se prepararon diluciones de referencia con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml, y las muestras, en el diluyente de muestra proporcionado con el conjunto de elementos para ELISA, con un volumen final de 60 µl. Debido a que los niveles de amiloide aumentan con la edad en el ratón, y debido a que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva de referencia, las muestras para el análisis de A $\beta$ (1-40) se sometieron a una dilución de 1:3, las muestras para el análisis de A $\beta$ (1-42) se sometieron a una dilución de 1:6.

20 Las muestras, las referencias y los blancos (50 µl) se agregaron a la placa de poliestirol recubierta con anti-A $\beta$  (el anticuerpo de captura reconoce selectivamente el extremo C terminal del antígeno), que además contenía un anticuerpo conjugado anti-A $\beta$  selectivo (anticuerpo de detección biotinilado), y se incubaron durante una noche a 4 °C con el objetivo de permitir la formación del complejo anticuerpo-amiloide-anticuerpo. Al día siguiente, se agregó un Conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa, seguido después de 30 minutos por el agregado de una mezcla de TMB/peróxido, lo que resultó en la conversión del sustrato a un producto coloreado. Esta reacción se detuvo mediante el agregado de ácido sulfúrico (1 M) y se midió la intensidad del color por medio de fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450 nm. La cuantificación del contenido de A $\beta$  de las muestras se realizó comparando la absorbancia con la curva de referencia preparada con A $\beta$ (1-40) sintético o A $\beta$ (1-42).  
A $\beta$  humano por ELISA en la fracción insoluble de un hemisferio

30 Para cuantificar la cantidad de A $\beta$ (1-40) humano y A $\beta$ (1-42) humano en la fracción de membrana insoluble de los homogeneizados de cerebro, las muestras de MCF se sometieron a un procesamiento adicional y se disolvieron en Guanidina 8 M en Tris/HCl 80 mM. Después, las muestras se incubaron durante 3 horas en un termomezclador a 25 °C y se pipetearon hacia arriba y hacia abajo con una pipeta de 100 µl cada hora para disolver el precipitado de MFC en el tampón de guanidina. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante sólo 1 minuto a 4000 rpm para eliminar los desechos.

El peso de los cerebros, el peso del precipitado de MFC y el volumen de tampón de guanidina 8 M se indican a modo de ejemplo en la siguiente tabla.

Muestra Nº	Tratamiento	ID de Ratón Nº	Peso de cerebro(W) (mg)	Peso Precipitado de MCF (WMCF) (cerebro 40 %)	Volumen Guanidina 8 M (WMCFx1,6) (µl)
19	x	TAB.TPF1305	157,8	63	101
21	x	TAB.TPF1335	160,2	64	103

40 Para cuantificar la cantidad de A $\beta$ (1-40) humano y A $\beta$ (1-42) humano en las muestras finales, se usaron los conjuntos de elementos disponibles comercialmente para Inmunoensayos Ligados a Enzima (ELISA) (ELISA de alta sensibilidad h Amyloid  $\beta$ 40 o  $\beta$ 42, The Genetics Company, Zúrich, Suiza). El ELISA se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante, excepto para la preparación de las referencias (una dilución de A $\beta$ (1-40) o A $\beta$ (1-42) sintéticos). Las muestras se prepararon en el diluyente de muestras, proporcionado con el conjunto de componentes para ELISA, con un volumen final de 60 µl. Debido a que la guanidina influye sobre los valores de DO de la curva de referencia, se prepararon diluciones de referencia con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml en diluyente para muestras con la misma concentración de guanidina que para las muestras. Esto se llevó a cabo en una placa de polipropileno de 96 pocillos sin la capacidad de unir proteínas (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania).

Debido a que los niveles de amiloide aumentan con la edad del ratón, y debido a que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva de referencia, las muestras para el análisis de A $\beta$ (1-40) insoluble y A $\beta$ (1-42) insoluble se sometieron a una dilución de 1:500.

5 Las muestras, las referencias y los blancos (50  $\mu$ l) se agregaron a la placa de poliestirol recubierta con anti-A $\beta$  (el anticuerpo de captura reconoce selectivamente el extremo C terminal del antígeno) que además contenía un anticuerpo conjugado anti-A $\beta$  selectivo (anticuerpo de detección biotinilado), y se incubaron durante una noche a 4 °C con el objetivo de permitir la formación del complejo anticuerpo-amiloide-anticuerpo. Al día siguiente, se agregó un Conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa, seguido después de 30 minutos por el agregado de una mezcla de  
10 TMB/peróxido, lo que resultó en la conversión del sustrato a un producto coloreado. Esta reacción se detuvo mediante el agregado de ácido sulfúrico (1 M) y se midió la intensidad del color por medio de fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450 nm. La cuantificación del contenido de A $\beta$  de las muestras se realizó comparando la absorbancia con la curva de referencia preparada con A $\beta$ (1-40) sintético o A $\beta$ (1-42).

15 Los resultados se ilustran en la Figura 5

Concentración de péptidos A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (1-40) solubles e insolubles en extractos de cerebro de ratones APP/PS1 Tg sometidos a una inmunización activa, ya sea con monómero A $\beta$ (1-42) (NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %), globulómero A $\beta$ (1-42), globulómero A $\beta$ (20-42), o bien con vehículo como control.

20 En las fracciones soluble e insoluble de un extracto de cerebro de ratones APP/PS1 Tg sometidos a una inmunización activa con globulómero A $\beta$ (20-42), el nivel de péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) no es significativamente diferente al del control con vehículo. Por el contrario, la inmunización con globulómero A $\beta$ (1-42) y monómero A $\beta$ (1-42) conduce a una reducción en los niveles cerebrales de A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42). Esto demuestra que la opción de  
25 inmunización con el globulómero A $\beta$ (20-42) no altera los niveles totales de A $\beta$  en cerebro en forma significativa, pero sin embargo es efectiva en la mejoría de los trastornos cognitivos relacionados con el péptido A $\beta$  (véase el ejemplo 4).

30 Ejemplo 7: Análisis del desempeño cognitivo con la prueba de reconocimiento de objetos en ratones transgénicos APP/L, después de inmunización pasiva con anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ (20-42)

En estos experimentos se usaron ratones que sobreexpresan APP humana con una mutación puntual. La mutación puntual hace referencia al aminoácido 717 (sustitución de valina por isoleucina), y se ha encontrado en una familia de Londres, donde lleva al inicio de la AD antes del comienzo de la sexta década de vida (Mullan *et al.*, Nature  
35 Genetics 2 (1992) 340-342). Los ratones transgénicos, de aquí en adelante denominados APP/L, fueron creados y descritos por primera vez en Leuven (Moechars *et al.*, J. Biol. Chem. 274 (1999) 6483-6492). Los ratones APP/L hembra se sometieron a una inmunización activa a los 3 meses de edad. Los ratones recibieron 250  $\mu$ g de alguno de los anticuerpos monoclonales de ratón 5F7, 10F11 o 7C6 en 100  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS). A lo largo del transcurso del experimento, los animales se mantuvieron bajo condiciones convencionales en un ciclo  
40 de día/noche invertido (14 horas de luz, comenzando a las 7 pm/10 horas de oscuridad). Los ratones toleraron bien la inmunización pasiva, sin ninguna señal de efectos adversos.

Después de la tercera inyección (día 15 de experimento), se probó la habilidad cognitiva de los ratones mediante una prueba de reconocimiento de objetos, tal como se describe en la técnica (Dewachter *et al.* Journal of  
45 Neuroscience 22 (2002) 3445-3453). Para este fin, los ratones se familiarizaron a una plataforma y se expusieron después durante 10 minutos en una fase de adquisición, durante la que se los colocó individualmente en la plataforma, que ahora contenía dos elementos idénticos (cubo verde o cilindro anaranjado de tamaño similar, aproximadamente 4 cm). Se registró la duración y la frecuencia con la que el ratón exploraba los objetos. Durante la fase de retención, 2,5 horas después, los ratones se colocaron nuevamente en la plataforma, que ahora contenía,  
50 además del objeto conocido, el otro objeto. Se registró el reconocimiento del objeto nuevo como el tiempo durante el que el ratón exploraba el objeto antiguo, en relación al tiempo total (exploración de objeto nuevo y viejo). El "índice de reconocimiento" expresa esta relación (tiempo para objeto nuevo/tiempo total). Un ratón que no recuerda el objeto conocido considerará que es igual de interesante que el objeto nuevo, y pasará una cantidad de tiempo igual en su exploración, en otras palabras, mostrará un índice de reconocimiento de 50 %. Un ratón que recuerda el  
55 objeto conocido considerará que no es interesante, y por lo tanto, presentará un índice de reconocimiento significativamente mayor. Se sabe que los ratones APP/L presentan deficiencias cognitivas a los 4,5 meses de edad y exhiben un índice de reconocimiento en la dimensión del nivel aleatorio, es decir, 50 %.

Los resultados se ilustran en la Figura 6.

60 Reconocimiento de objetos en ratones. En la prueba se informa del reconocimiento de un objeto conocido en comparación con uno desconocido, medido en términos de comportamiento de exploración durante una fase de prueba de 10 minutos. El índice de reconocimiento se define como el porcentaje de tiempo que el ratón ocupa explorando el objeto desconocido en relación al tiempo que pasa explorando ambos objetos. El objeto conocido fue  
65 explorado por el ratón durante una fase de adquisición de 10 minutos, 2,5 horas antes de la fase de prueba.

a) Se inmunizaron ratones transgénicos APP una vez a la semana durante tres semanas con una inyección intraperitoneal de 250 µg del anticuerpo 5F7 (n = 9), el anticuerpo 10F11 (n = 11) o el anticuerpo 7C6 (n = 11); los animales control recibieron PBS (n = 6). Las diferencias significativas contra el nivel aleatorio (50 %, es decir, un tiempo de exploración igual transcurrido con el objeto conocido y el desconocido) se indican con asteriscos. \* = p < 0,05 (prueba t)

b) Comparación de todos los ratones tratados con anticuerpos (5F7, 10F11 y 7C6; (n = 31)) y ratones tratados con solución salina tamponada con fosfato (PBS; n = 6). El RI del grupo tratado con anticuerpo fue significativamente diferente del nivel aleatorio (\*\* = P<0,01; prueba t).

Se sabe que los ratones APP/L presentan deficiencias cognitivas a los 4,5 meses de edad y exhiben un índice de reconocimiento en la dimensión del nivel aleatorio, es decir, 50 %.

Efectivamente, los ratones tratados con PBS presentaron un comportamiento al azar. La inmunización pasiva con los tres anticuerpos (5F7, 10F11 y 7C6) resultó en un incremento marcado del índice de reconocimiento. Comparados con los controles como un solo grupo, el índice de reconocimiento se incrementó en forma significativa. Este efecto beneficioso sobre el desempeño de la memoria de los ratones APP/L después de la administración de los tres anticuerpos sugiere que un anticuerpo contra el globulímero Aβ(20-42) truncado es suficiente para obtener una mejora de la cognición.

Ejemplo 8: Perfil de transferencia puntual de la selectividad de los anticuerpos anti-globulímero Aβ(20-42)

Con el objetivo de caracterizar la selectividad de los anticuerpos monoclonales anti-globulímero Aβ(20-42), se evaluaron para determinar el reconocimiento de diferentes formas de Aβ. Para este objetivo, se hicieron diluciones en serie de las formas individuales de Aβ(1-42) en el rango de entre 100 pmol/µl y 0,01 pmol/µl, en PBS suplementado con 0,2 mg/ml de BSA. Se transfirió 1 µl de cada muestra a una membrana de nitrocelulosa. Para la detección se usó el anticuerpo correspondiente (0,2 µg/ml). La inmunocoloración se hizo usando anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa y el reactivo de coloración, sustrato BM Blue POD (Roche).

Referencias de Aβ para la transferencia puntual:

1. Monómero Aβ(1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %

Se disolvió 1 mg de Aβ(1-42) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O (recién preparado) (= 2 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

2. Monómero Aβ(1-40), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %

Se disolvieron 1 mg de Aβ(1-40) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O (recién preparada) (= 2 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

3. Monómero Aβ(1-42), NaOH al 0,1 %

Se disolvieron 2,5 mg de Aβ(1-42) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml de NaOH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O (recién preparada) (= 5 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

4. Monómero Aβ(1-40), NaOH al 0,1 %

Se disolvieron 2,5 mg de Aβ(1-40) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml de NaOH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O (recién preparada) (= 5 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

5. Globulímero Aβ(1-42)

La preparación del globulímero Aβ(1-42) se describe en el ejemplo 1a.

6. Globulímero Aβ(12-42)

La preparación del globulímero Aβ(12-42) se describe en el ejemplo 1d.

7. Globulímero Aβ(20-42)

La preparación del globulímero Aβ(20-42) se describe en el ejemplo 1c.

8. Fibrillas Aβ(1-42)

Se disolvió 1 mg de Aβ(1-42) (Bachem Inc. N° de cat. H-1368) en 500 µl de NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % acuoso (tubo Eppendorf) y la muestra se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se neutralizaron 100 µl de esta solución de Aβ(1-42) recién preparada con 300 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4. El pH se ajustó a pH 7,4 con 1 % de HCl. La muestra se incubó durante 24 h a 37 °C y se centrifugó (10 minutos a 10000 g). El sobrenadante se descartó y se resuspendió el precipitado de fibrillas con 400 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140

## ES 2 527 661 T3

mM, pH 7,4 por agitación vorticial durante 1 minuto.

### 9. sAPP $\alpha$

5 Proporcionado por Sigma (N° de catálogo S9564; 25  $\mu$ g en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). El sAPP $\alpha$  se diluyó a razón de 0,1 mg/ml (= 1 pmol/ $\mu$ l) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA.

Materiales para la transferencia puntual:

### Referencias de A $\beta$ :

10 Dilución en serie de antígenos A $\beta$  en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 + 0,2 mg/ml de BSA

- 15
- 1) 100 pmol/ $\mu$ l
  - 2) 10 pmol/ $\mu$ l
  - 3) 1 pmol/ $\mu$ l
  - 4) 0,1 pmol/ $\mu$ l
  - 5) 0,01 pmol/ $\mu$ l

### Nitrocelulosa:

20 Medio Trans-Blot Transfer, Membrana de Nitrocelulosa Pura (0,45  $\mu$ m); BIO-RAD

### Anti-POD de Ratón:

N° de catálogo: 715-035-150 (Jackson Immuno Research)

### 25 Reactivo de detección:

Sustrato BM Blue POD, precipitante (Roche)

### Albúmina de suero bovino (BSA):

30 N° de catálogo: A-7888 (SIGMA)

### Reactivo de bloqueo:

5 % de leche descremada en TBS

### Soluciones de tampón:

#### 35 TBS

25 mM de tampón de Tris/HCl, pH 7,5  
+ NaCl 150 mM

#### 40 TTBS

25 mM de tampón de Tris/HCl, pH 7,5  
+ NaCl 150 mM  
+ 0,05 % de Tween 20

#### 45 PBS + 0,2 mg/ml de BSA

Tampón de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,4  
+ NaCl 140 mM  
+ 0,2 mg/ml de BSA

### Solución de anticuerpo I:

50 0,2  $\mu$ g/ml de anticuerpo diluido en 20 ml de leche descremada al 1 % en TBS

### Solución de anticuerpo II:

55 Dilución 1:5000  
Anti-POD de Ratón en leche descremada al 1 % en TBS

Procedimiento para la transferencia puntual:

60 1) Se transfirió 1  $\mu$ l de cada una de las distintas referencias de A $\beta$  (en sus 5 diluciones en serie) a la membrana de nitrocelulosa, con una distancia de aproximadamente 1 cm una de la otra.

2) Las referencias de A $\beta$  se dejaron secar sobre la membrana de nitrocelulosa al aire durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (TA) (= transferencia puntual)

65 3) Bloqueo:

La transferencia puntual se incubó con 30 ml de leche descremada al 5 % en TBS durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

4) Lavado:

5 Se descartó la solución de bloqueo, y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

5) Solución de anticuerpo I:

10 Se descartó el tampón de lavado y se incubó la transferencia puntual con solución de anticuerpo I durante 2 horas a TA.

6) Lavado:

15 Se descartó la solución de anticuerpo I y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. Se descartó la solución de lavado y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. Se descartó la solución de lavado y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA.

7) Solución de anticuerpo II:

25 Se descartó el tampón de lavado y se incubó la transferencia puntual con solución de anticuerpo II durante una noche a TA.

8) Lavado:

30 Se descartó la solución de anticuerpo II y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó la solución de lavado y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. Se descartó la solución de lavado y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA.

9) Revelado:

35 Se descartó la solución de lavado. Se reveló la transferencia puntual con 10 ml de Sustrato BM Blue POD durante 10 minutos. Se detuvo el relevado mediante el lavado intensivo de la transferencia puntual con H<sub>2</sub>O. La evaluación cuantitativa de la intensidad de las transferencias se realizó usando un análisis por densitómetro (densitómetro GS800 (BioRad) y el conjunto de software Quantity one, Versión 4.5.0 (BioRad)). Solo se evaluaron las transferencias que presentaron una densidad relativa mayor que 20 % de la densidad relativa de la última transferencia del globulómero Aβ(20-42) identificado por medios ópticos sin ambigüedad. Se determinó este valor umbral para cada transferencia puntual en forma independiente. El valor calculado indica la relación entre el reconocimiento del globulómero Aβ(20-42) y la forma de Aβ respectiva para el anticuerpo dado.

45 Los resultados se ilustran en la Figura 7.

50 Análisis por transferencia puntual de la especificidad de diferentes anticuerpos anti-Aβ (6E10, 5F7, 4B7, 10F11, 6A2, 4D10, 2F2; 3B10, 7C6, 7E5, 10C1) por diferentes formas de Aβ. Los anticuerpos monoclonales probados se obtuvieron (excepto por 6E10) mediante la inmunización activa de ratones con el globulómero Aβ(20-42), seguida por la selección de las células de hibridoma fusionadas. Las formas individuales de Aβ se aplicaron en diluciones en serie y se incubaron con los anticuerpos respectivos para provocar la reacción inmune.

1. Monómero Aβ(1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %
2. Monómero Aβ(1-40), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %
- 55 3. Monómero Aβ(1-42), NaOH al 0,1 %
4. Monómero Aβ(1-40), NaOH al 0,1 %
5. Globulómero Aβ(1-42)
6. Globulómero Aβ(12-42)
7. Globulómero Aβ(20-42)
- 60 8. Preparación fibrilar Aβ(1-42)
9. sAPPα (Sigma); (primera transferencia: 1 pmol)

65 Los mAb selectivos anti globulómero Aβ(20-42) pueden dividirse en 3 clases con relación a la discriminación del globulómero Aβ(1-42) y el globulómero Aβ(12-42). La primera clase, que comprende los anticuerpos 6A2, 5F7 y 2F2, reconoce con preferencia al globulómero Aβ(20-42), y en algún grado al globulómero Aβ(1-42) (y también al globulómero Aβ(12-42)). La segunda clase, que comprende los anticuerpos 10F11, 4D10 y 3B10, reconoce con

preferencia al globulímero A $\beta$ (20-42), y también reconoce al globulímero A $\beta$ (12-42), pero en un menor grado y no reconoce significativamente al globulímero A $\beta$ (1-42). La tercera clase, que comprende los anticuerpos 7C6, 4B7, 7E5 y 10C1, reconoce al globulímero A $\beta$ (20-42) pero no muestra un reconocimiento significativo por los otros. Las tres clases no reconocen significativamente al A $\beta$ (1-42) monomérico, al A $\beta$ (1-40) monomérico, a las fibrillas A $\beta$ (1-42) o a sAPP $\alpha$ .

El perfil de selectividad de los anticuerpos anti-globulímero A $\beta$ (20-42) muestra que el índice de reconocimiento significativamente elevado en la inmunización pasiva (en Figura 6) se debe principalmente a un reconocimiento selectivo del globulímero A $\beta$ (20-42) y el globulímero A $\beta$ (12-42) truncados, y en una extensión mucho menor, al globulímero A $\beta$ (1-42), y no al A $\beta$ (1-42) monomérico, el A $\beta$ (1-40) monomérico, las fibrillas A $\beta$ (1-42) o sAPP $\alpha$ .

Ejemplo 9: análisis *in situ* de la reacción específica de anticuerpos selectivos A $\beta$ (20-42) contra el péptido A $\beta$  fibrilar en forma de placas A $\beta$  en ratones TG2576 viejos, y el amiloide A $\beta$  en vasos de las meninges

Para estos experimentos se usó material de cerebro de ratones TG2576 de 19 meses de edad (Hsiao *et al.*, 1996, Science; 274(5284), 99-102) o de ratones APP/LxPS1 de 9 meses de edad (como se describió con anterioridad; ReMYND, Leuven, Bélgica), o material de autopsia de dos pacientes con enfermedad de Alzheimer (RZ16 y RZ55; obtenidos de BrainNet, Múnich). Los ratones sobreexpresan APP humana con la denominada mutación sueca (K670N/M671L; Tg2576) o la denominada mutación de Londres (V717I), junto con el gen de Presenilina 1 humano con la mutación A264E (APP/LxPS1) y depósitos  $\beta$  amiloides formados en el parénquima cerebral a una edad de aproximadamente entre 7 y 11 meses de edad, y depósitos  $\beta$  amiloides en vasos cerebrales mayores a una edad de aproximadamente 18 meses de edad (Tg2576). Los animales se sometieron a una anestesia profunda y una perfusión transcardíaca con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M para lavar la sangre. Luego se extrajo el cerebro del cráneo y se dividió en forma longitudinal. Se congeló rápidamente un hemisferio del cerebro, el otro se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4 %. El hemisferio fijado por inmersión se crioprotegió sumergiéndolo en sacarosa al 30 % en PBS y se montó en un micrótopo con congelación. Se cortó el cerebro anterior completo en secciones de 40  $\mu$ m que se recolectaron en PBS y se usaron para el subsiguiente procedimiento de coloración. El material cerebral humano era un bloque de neocorteza de alrededor de 1 cm<sup>3</sup> congelado rápidamente. Una pequeña parte del bloque se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4 %, y luego se trató como el material de cerebro de ratón.

Las secciones individuales se colorearon con rojo Congo usando el siguiente protocolo:

Material:

- Conjunto de componentes para el marcado del péptido amiloide rojo Congo (Sigma-Aldrich; HT-60), que consiste en una solución alcohólica de NaCl, solución de NaOH y solución de rojo Congo
- cubetas de coloración
- portaobjetos y cubreobjetos para microscopio SuperfrostPlus
- Etanol, Xilol, medio para embeber.

Reactivos:

- NaOH en una dilución 1:100 con solución de NaCl, lo que resulta en una solución salina alcalina
- solución salina alcalina en una dilución 1:100 con solución de rojo Congo, lo que resulta en una solución alcalina de rojo Congo (preparada no más de 15 minutos antes de su uso, filtrada)
- se montan las secciones en los portaobjetos y se las deja secar
- se incuban los portaobjetos en una cubeta de coloración, primero durante 30-40 minutos en solución salina alcalina, luego durante 30-40 minutos en solución de rojo Congo alcalina
- se lava tres veces con etanol fresco y se embebe con xilol

Primero se fotografió la coloración usando un microscopio Zeiss Axioplan y se realizó una evaluación cualitativa. El color rojo indicó depósitos de péptido amiloide en forma de placas y en los grandes vasos meníngeos. Estos resultados se ilustran en la Fig. 8A. Más adelante, la evaluación de la coloración del anticuerpo se centró en estas estructuras.

La coloración de los anticuerpos se llevó a cabo incubando las secciones con una solución con entre 0,07 y 7,0  $\mu$ g/ml del anticuerpo respectivo de acuerdo con el siguiente protocolo:

Materiales:

- solución de lavado TBST (solución salina tamponada con Tween 20; con una concentración 10x; DakoCytomation; S3306 1:10 en agua bidestilada)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3 % en metanol
- suero de burro (Serotec), 5 % en TBST
- anticuerpo monoclonal de ratón anti-globulímero diluido en TBST

- anticuerpo secundario: anticuerpo biotinilado de burro anti-ratón (Jackson Immuno; 715-065-150; diluido 1:500 en TBST)
- StreptABComplex (DakoCytomation; K 0377)
- Conjunto de componentes de sustrato para peroxidasa de diaminobenzidina (= DAB; Vector Laboratories; SK-4100)
- portaobjetos y cubreobjetos para microscopio SuperFrost Plus
- medio para embeber libre de xilol (Meditate; X-tra Kitt)

Procedimiento:

- se transfieren las secciones flotantes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3 % enhiada en hielo y se incuba durante 30 minutos
- se lava durante 5 minutos en tampón TBST
- se incuba con suero de burro/TBST durante 20 minutos
- se incuba con anticuerpo primario durante 24 horas a temperatura ambiente
- se lava en tampón de TBST durante 5 minutos
- se incuba con suero de bloqueo del conjunto de componentes de peroxidasa Vectastain Elite ABC durante 20 minutos
- se lava en tampón de TBST durante 5 minutos
- se incuba con anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente
- se lava en tampón de TBST durante 5 minutos
- se incuba con StreptABComplex durante 60 minutos a temperatura ambiente
- se lava en tampón de TBST durante 5 minutos
- se incuba con DAB del conjunto de componentes de peroxidasa Vectastain Elite ABC durante 20 minutos
- se monta la sección en portaobjetos, se secan al aire, se deshidratan con alcohol y se embeben

Además de la inspección visual de las tinciones, se cuantificó la coloración de las placas mediante la extracción gráfica de 10 placas elegidas al azar de las imágenes histológicas usando el sistema de análisis de imágenes ImagePro 5.0, y se determinó su valor promedio en una escala de grises. Se calcularon los valores de densidad óptica a partir de los valores en escala de grises, sustrayendo la densidad de fondo promedio del material coloreado de la densidad de las placas amiloides (0 %: ausencia coloración de placas sobre el fondo circundante, 100 %: ausencia de transmisión/coloración máxima), y se evaluaron las diferencias entre el control y los anticuerpos, y entre 6G1 y los anticuerpos selectivos para Aβ(20-42), respectivamente, para observar su significación estadística mediante ANOVA.

Los resultados de las tinciones en ratones Tg2576 y APP/LxPS1 se ilustran en las Figura 8 B-D y H.

Unión de diferentes anticuerpos en una concentración de 0,7 µg/ml en una sección transversal de neocorteza de ratones TG 2576 transgénicos de 19 meses de edad:

C) Los depósitos de Aβ parenquimáticos (placas amiloides) se colorearon solamente con 6G1 y 6E10, pero no con los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).

D) Todos los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1) presentaron una coloración significativamente menor de las placas de parénquima en comparación con los anticuerpos comercialmente disponibles 6E10 y 4G8.

Unión de diferentes anticuerpos con una concentración de entre 0,07 y 7,0 µg/ml en sección transversal de la neocorteza de ratones APP/LxPS1 transgénicos a los 11 meses de edad:

E) Los depósitos de Aβ parenquimáticos (placas amiloides) presentaron una coloración significativamente mayor y a concentraciones menores con 6G1, 6E10 y 4G8 que con los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).

Todos los depósitos amiloides se habían verificado con antelación con una coloración congofílica (Congo Red; véase la Fig. 8A). Barra = 100 µm.

La evaluación de los depósitos de DAB marrones demostró que los anticuerpos no selectivos para Aβ 6G1 y 6E10 colorearon las placas y los vasos meníngeos, mientras que los anticuerpos selectivos para el globulómero Aβ(20-42) 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1 no lo hicieron. Este descubrimiento demuestra que no hay unión a las fibrillas Aβ u otras especies de Aβ presentes en las estructuras amiloides *in vivo*, o que dicha unión es marcadamente menor para los anticuerpos mencionados. Se supone que esta unión reducida reduce el peligro de efectos colaterales inducidos por una disolución muy rápida de las placas, y el subsiguiente incremento de Aβ soluble o la neuroinflamación debida a la interacción de los anticuerpos unidos a placa con la microglía.

Los resultados de la coloración en cerebro humano con enfermedad de Alzheimer se ilustran en las Figura 8 B, F-H.



Unión de diferentes anticuerpos con una concentración de 0,7 µg/ml en una sección transversal de la neocorteza del paciente RZ55:

- 5 B) Los depósitos de parénquima de Aβ (placas amiloides) se colorearon solo con 6G1 y 6E10, pero no con los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).  
 F) Todos los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1) presentaron una coloración significativamente menor en comparación con los anticuerpos comercialmente disponibles 6E10 y 4G8.  
 10 H) Los depósitos vasculares de Aβ (flechas) se colorearon solo con 6G1 y 6E10, pero no con anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).  
 Unión de diferentes anticuerpos con una concentración de entre 0,07 y 7,0 µg/ml en sección transversal de neocorteza de ratones APP/LxPS1 transgénicos a los 11 meses de edad:  
 15 G) Los depósitos de Aβ en parénquima (placas amiloides) presentaron una coloración significativamente mayor y a menores concentraciones con 6G1, 6E10 y 4G8 que con los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).

Todos los depósitos amiloides se habían verificado con antelación con una coloración congofílica (Congo Red; véase la Fig. 8A).

- 20 La evaluación de los depósitos marrones de DAB demostró que los anticuerpos no selectivos Aβ 6G1 y 6E10 colorearon las placas y los vasos meníngeos, mientras que los anticuerpos selectivos del globulómero Aβ(20-42) 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1 no lo hicieron. Los anticuerpos disponibles comercialmente 6E10 y 4G8 presentaron una coloración mayor en comparación con los anticuerpos selectivos para globulómero, pero menor coloración que 6G1. Este descubrimiento confirma el patrón de coloración en ratones transgénicos APP,  
 25 donde no hay unión a la fibrillas Aβ u otras especies de Aβ presentes en las estructuras amiloides *in vivo*, o donde dicha unión es marcadamente menor para los anticuerpos selectivos para el globulómero. Se supone que esta unión reducida a los péptidos amiloides humanos reduce el peligro de efectos colaterales inducidos por la disolución muy rápida de las placas y el subsiguiente incremento de Aβ soluble o la neuroinflamación debida a la interacción de los anticuerpos unidos a placa con la microglía.

- 30 Ejemplo 10: Titulación de anticuerpo anti-Aβ y perfil de sensibilidad de la transferencia puntual en plasma de ratones TG2576 aproximadamente un año después de la inmunización activa

- Aproximadamente un año después de la última inmunización (con globulómero Aβ(20-42), globulómero Aβ(12-42),  
 35 monómero Aβ(1-42) y vehículo) en ratones Tg 2576 (del ejemplo 9), se evaluaron los anticuerpos anti-Aβ producidos y aún presentes en muestras de plasma. Para este objetivo, se realizaron diluciones en serie de las distintas formas de Aβ(1-42) en el rango de concentración entre 100 pmol/µl y 0,01 pmol/µl en PBS + 0,2 mg/ml de BSA. De cada muestra, se aplicó 1 µl sobre una membrana de nitrocelulosa. La detección se llevó a cabo con muestras de plasma de ratón apropiadas (con una dilución de 1:400). La coloración se llevó a cabo con IgG anti-ratón conjugada con  
 40 fosfatasa alcalina, y con la adición del reactivo de coloración NBT/BCIP.

Referencias de Aβ para transferencia puntual:

- 45 1. Globulómero Aβ(1-42)  
 La preparación del globulómero Aβ(1-42) se describe en el ejemplo 1a.
2. Monómero Aβ(1-42) pretratado con HFIP en Pluronic F68  
 Se disolvieron 3 mg de Aβ(1-42), (Bachem Inc.; N° de catálogo H-1368) en 0,5 ml de HFIP (suspensión de 6 mg/ml) en un tubo Eppendorff de 1,7 ml y se agitó (mezclador Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a  
 50 37 °C hasta obtener una solución transparente. La muestra se secó en un concentrador SpeedVac (1,5 horas) y se resuspendió en 13,2 µl de DMSO, se agitó durante 10 segundos, a lo que siguió una sonicación (20 segundos) y una agitación (por ejemplo en mezclador Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos. Se agregaron 6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; 0,1 % de Pluronic F68; pH 7,4, y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 3000 g. El sobrenadante se descartó, y el precipitado se disolvió en 0,6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; 1 % de Pluronic F68, pH 7,4. Se agregaron  
 55 3,4 ml de H<sub>2</sub>O y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, a lo que siguieron 20 minutos de centrifugación a 3000 g. Se almacenaron ocho alícuotas del sobrenadante de 0,5 ml cada una a -20 °C para su uso posterior.
3. Globulómero Aβ(20-42)  
 60 La preparación del globulómero Aβ(20-42) se describe en el ejemplo 1c.
4. Globulómero Aβ(12-42)  
 La preparación del globulómero Aβ(12-42) se describe en el ejemplo 1d.
- 65 5. Monómero Aβ(1-40), HFIP pretratado, 5 mM en DMSO  
 Se resuspendió 1 mg de Aβ(1-40), (Bachem Inc, N° de cat. H-1194) en 0,25 ml de HFIP (suspensión de 4 mg/ml)

en un tubo Eppendorff. Se agitó el tubo (por ejemplo en mezclador Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37 °C para obtener una solución transparente, y luego se secó en un concentrador SpeedVac (durante 1,5 horas). La muestra se disolvió una vez más en 46 µl de DMSO (solución de 21,7 mg/ml = 5 mM), se agitó durante 10 segundos, y luego se sonicó durante 20 segundos. Después de agitar (por ejemplo, en un mezclador Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos, la muestra se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

6. Monómero Aβ(1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %

Se disolvió 1 mg de Aβ(1-42) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml NH<sub>4</sub>OH al 0,1 % en H<sub>2</sub>O (recién preparada) (= 2 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

7. Fibrillas Aβ(1-42)

Se disolvió 1 mg de Aβ(1-42) (Bachem Inc. Catálogo N° H-1368) en 500 µl de NH<sub>4</sub>OH acuoso al 0,1 % (tubo Eppendorff), y la muestra se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se neutralizaron 100 µl de esta solución recién preparada de Aβ(1-42) con 300 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4. El pH se ajustó a pH 7,4 con HCl al 1 %. La muestra se incubó durante 24 horas a 37 °C y se centrifugó (10 minutos a 10000 g). El sobrenadante se descartó y el precipitado de fibrillas se suspendió nuevamente con 400 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4, por agitación vorticial durante 1 minuto.

8. sAPPα

Proporcionado por Sigma (N° de catálogo S9564; 25 µg en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). El sAPPα se diluyó con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA a razón de 0,1 mg/ml (= 1 pmol/µl).

Materiales para transferencia puntual:

Referencias de Aβ:

Dilución en serie de antígenos Aβ en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 + 0,2 mg/ml de BSA

- 1) 100 pmol/µl
- 2) 10 pmol/µl
- 3) 1 pmol/µl
- 4) 0,1 pmol/µl
- 5) 0,01 pmol/µl

Nitrocelulosa:

Medio de Transferencia Trans-Blot, Membrana de Nitrocelulosa Pura (0,45 µm); BIO-RAD

Anti-AP de ratón:

AQ330A (Chemicon)

Reactivo de detección:

Comprimidos NBT/BCIP (Roche)

Seroalbúmina Bovina, (BSA):

A-7888 (Fa. SIGMA)

Reactivo de bloqueo:

Leche descremada al 5 % en TBS

Soluciones de tampón:

TBS  
25 mM de Tris/HCl – tampón pH 7,5  
+ NaCl 150 mM

TTBS  
25 mM de Tris/HCl - tampón pH 7,5  
+ NaCl 150 mM  
+ 0,05 % de Tween 20

PBS + 0,2 mg/ml de BSA  
Tampón de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,4  
+ NaCl 140 mM  
+ 0,2 mg/ml de BSA

Solución de anticuerpo I:

Plasma de ratones TG2576 sometidos a una inmunización activa, diluido 1/400 en 20 ml de leche descremada al 1 % en TBS

5 Solución de anticuerpo II:

Dilución 1:5000

Anti-AP de ratón en leche descremada al 1 % en TBS

Procedimiento para transferencia puntual:

10

1) Se transfiere 1  $\mu$ l de cada una de las distintas referencias de A $\beta$  (en sus 5 diluciones en serie) a la membrana de nitrocelulosa, con una distancia de aproximadamente 1 cm una de la otra.

15

2) Las transferencias de las referencias de A $\beta$  se dejan secar sobre la membrana de nitrocelulosa al aire durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (TA) (= transferencia puntual)

3) Bloqueo:

20

La transferencia puntual se incuba con 30 ml de leche descremada al 5 % en TBS durante 1,5 horas a TA.

4) Lavado:

25

Se descarta la solución de bloqueo y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA.

5) Solución de anticuerpo I:

30

Se descarta el tampón de lavado y se incuba la transferencia puntual con solución de anticuerpo I durante una noche a TA.

6) Lavado:

35

Se descarta la solución de anticuerpo I y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. Se descarta la solución de lavado y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA. Se descarta la solución de lavado y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA.

7) Solución de anticuerpo II:

40

Se descarta el tampón de lavado y se incuba la transferencia puntual con solución de anticuerpo II durante 1 hora a TA.

8) Lavado:

45

Se descarta la solución de anticuerpo II y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descarta la solución de lavado y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descarta la solución de lavado y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a TA.

50

9) Revelado:

55

Se descarta la solución de lavado. Se disuelve 1 comprimido de NBT/BCIP en 20 ml de H<sub>2</sub>O, y la transferencia puntual se incuba durante 5 minutos con esta solución. El revelado se detiene con un lavado intenso con H<sub>2</sub>O.

Los resultados se ilustran en la Figura 9.

60

Se probaron sueros de diferentes grupos de inmunización: a) globulómeros A $\beta$ (20-42); b) globulómeros A $\beta$ (12-42); c) monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %; d) vehículo control contra distintas formas de A $\beta$  en una transferencia puntual para perfiles de anticuerpo diferentes.

65

1. Globulómero A $\beta$ (1-42)
2. Monómero A $\beta$ (1-42), pretratado con HFIP, en 0,1 % de Pluronic F68
3. Globulómero A $\beta$ (20-42)
4. Globulómero A $\beta$ (12-42)

5. Monómero A $\beta$ (1-40), pretratado con HFIP, 5 mM en DMSO
6. Monómero A $\beta$ (1-42), disuelto en NH<sub>4</sub>OH al 0,1 %
7. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42)
8. sAPP $\alpha$  (Sigma); (primera transferencia: 1 pmol)

5 En contraste con las inmunizaciones activas con vehículo como control o monómero A $\beta$ (1-42), la inmunización con globulómero A $\beta$ (20-42) o globulómero A $\beta$ (12-42), aun después de aproximadamente un año de la última inmunización, presenta una mayor titulación de anticuerpos. Estos anticuerpos son selectivos para el globulómero A $\beta$ (20-42) en el caso de la inmunización con el globulómero A $\beta$ (20-42), o son selectivos para el globulómero A $\beta$ (20-42) y para el globulómero A $\beta$ (12-42) en el caso de la inmunización con el globulómero A $\beta$ (12-42). Esto demuestra que el globulómero truncado A $\beta$ (20-42) y el globulómero A $\beta$ (12-42) representan un muy buen antígeno, y que los anticuerpos dirigidos contra ellos persisten largo tiempo *in vivo*.

15 (Obsérvese que en algunas transferencias puntuales se observa una señal de coloración inespecífica que muy probablemente es una reacción de los anticuerpos murinos con la BSA que se usa en las diluciones en serie de los péptidos A $\beta$ ).

Ejemplo 11: Niveles de epítomos de globulómero A $\beta$ (20-42) en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer

20 Extracto de cerebro SDS-DTT:

Muestras de cerebro con enfermedad de Alzheimer: RZ 16; RZ 52 y RZ 55 (obtenidas en Brain Net, Múnich) Muestra control: RZ 92 (obtenida en Brain Net, Múnich)

25 Se disuelve una comprimido de Inhibidor de Proteasa Completo (Roche, N° de cat. 1697 498) en 1 ml de H<sub>2</sub>O (= solución de inhibidor de proteasa). Se homogeneizan 100 mg de muestra de cerebro con enfermedad de Alzheimer en 2,5 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl 140 mM, 0,05 % de Tween 20, 0,5 % de BSA (suplementada con 25  $\mu$ l de solución de inhibidor de proteasa) con 20 golpes en un mortero de vidrio. Se sonica la suspensión durante 30 segundos en hielo, luego se incuba a 37 °C durante 16 horas. Se centrifuga la suspensión a 100000 g y 8 °C durante una hora, luego se recolecta el sobrenadante. Se disuelve el resto en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, y se homogeniza con 10 golpes en un mortero de vidrio. Se agregan 75  $\mu$ l de SDS al 10 % y 125  $\mu$ l de 0,16 mg/ml de DTT, y se agita durante 20 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifuga durante 10 minutos a 10000 g, y el sobrenadante se almacena durante una noche a -20 °C. Antes de usarlo, el sobrenadante se descongela y se centrifuga otros 10 minutos a 10000 g. El sobrenadante (= extracto de cerebro SDS/DTT) se usa para un ELISA.

35 a) ELISA sándwich para el epítomo de globulómero A $\beta$ (20-42)

40 Lista de reactivos:

1. Inmuno-Placa F96 Cert. Maxisorp NUNC (N° de cat. 439454)
2. Anticuerpo de unión: 5F7, 7C6, 10F11
3. Agente de acoplamiento:

45 carbonato de hidrógeno de sodio 100 mM, pH 9,6

4. Reactivo de bloqueo para ELISA (Roche Diagnostics GmbH N° de cat. 1112589)
5. Tampón PBST:

50 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4

6. Referencia de calibración de A $\beta$ (20-42)
7. Anticuerpo primario:

55 anti-A $\beta$  pRab BA199; purificado por afinidad (en Sepharose con globulómero A $\beta$ (1-42)), solución de IgG en PBS; concentración: 0,22 mg/ml

8. Anticuerpo secundario:

60 anti-conejo conjugado con POD; (Jackson ImmunoResearch, N° de cat. 111-036-045)

9. Revelado:

- TMB; (Roche Diagnostics GmbH N° de cat. 92817060), 42 mM en DMSO
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % en H<sub>2</sub>O
- acetato de sodio 100 mM, pH 4,9

- Solución de terminación: ácido sulfúrico 2 M

Preparación de reactivos:

5 1. Anticuerpo de unión:

Los anticuerpos de unión individuales 5F7, 7C6 y 10F11 se diluyen hasta una concentración final de 0,7 µg/ml en tampón de acoplamiento.

10 2. Reactivo de bloqueo:

Para la preparación de la solución madre de bloqueo, se disuelve el reactivo de bloqueo en 100 ml de H<sub>2</sub>O y se almacena a -20 °C en alícuotas de 10 ml cada una.

Se diluyen 3 ml de la solución madre de bloqueo con 27 ml de H<sub>2</sub>O para bloquear una placa de ELISA.

15

3. Referencia de calibración de Aβ(20-42) (CS1)

La preparación del globulímero Aβ(1-42) se describe en el ejemplo 1a.

20 Se determinó la concentración de proteínas de globulímero Aβ(20-42) (6,81 mg/ml) de acuerdo con Bradford (BioRad). Se diluyen 14,68 µl de globulímero Aβ(20-42) (6,81 mg/ml) en 10 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4, 0,5 % de BSA (= 10 µg/ml). Se diluyen adicionalmente 10 µl de la solución, a razón de 10 µg/ml, en 10 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4, 0,5 % de BSA (= 10 ng/ml = CS1)

25 Referencias de calibración para Aβ(20-42):

Referencia de calibración	Volumen de referencia de calibración	PBST + 0,5 % de BSA	Concentración final Aβ(20-42) (pg/ml)
CS1.1	1 ml de CS1	0 ml	10000
CS1.2	0,316 ml de CS1,1	0,684 ml	3160
CS1.3	0,316 ml de CS1,2	0,684 ml	1000
CS1.4	0,316 ml de CS1,3	0,684 ml	316
CS1.5	0,316 ml de CS1,4	0,684 ml	100
CS1.6	0,316 ml de CS1,5	0,684 ml	31,6
CS1.7	0,316 ml de CS1,6	0,684 ml	10
CS1.8	0,0	1,0 ml	0,0

Extractos de cerebro SDS/DTT:

Extractos de cerebro SDS/DTT = E#

30 (# representa las 4 muestras de cerebro humano (1) RZ 16; (2) RZ 52; (3) RZ 55; (4) RZ 92)

muestra de extracción	volumen de muestra de extracción	PBST + 0,5 % de BSA	factor de dilución
E#.1	1 ml de E#	0,0 ml	directo
E#.2	0,316 ml de E#,1	0,684 ml	1:3,16
E#.3	0,316 ml de E#,1	0,684 ml	1:10
E#.4	0,316 ml de E#,1	0,684 ml	1:31,6

4. Anticuerpo primario:

35 Se diluye la solución madre de anti-Aβ pRAB a 0,05 µg/ml en PBST + 0,5 % de BSA. La solución de anticuerpo se usa inmediatamente.

5. Anticuerpo secundario:

40 Se disuelve anti-conejo conjugado con POD liofilizado en 0,5 ml de H<sub>2</sub>O y se mezcla con 500 µl de glicerol. Después, el concentrado de anticuerpo se almacena a -20 °C en alícuotas de 100 µl.

El concentrado se somete a una dilución de 1:10000 en tampón de PBST. La solución de anticuerpo se usa inmediatamente.

45 6. Solución de TMB:

Se mezclan 20 ml de acetato de sodio 100 mM, pH 4,9, con 200 µl de solución de TMB y 29,5 µl de peróxido de hidrógeno al 3 %. Esta solución se usa inmediatamente.

50

Placa de ELISA para A $\beta$ (20-42):

Los referencias de calibración (CS1.1-CS1.8) y los extractos de cerebro SDS/DTT de las 4 muestras humanas (1) RZ 16; (2) RZ 52; (3) RZ 55; (4) RZ 92 (= E1-E4 en sus 4 diluciones en serie E#.1-E#.4) se determinan por duplicado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CS1.1	CS1.1	E1.1	E1.1	E3.1	E3.1						
B	CS1.2	CS1.2	E1.2	E1.2	E3.2	E3.2						
C	CS1.3	CS1.3	E1.3	E1.3	E3.3	E3.3						
D	CS1.4	CS1.4	E1.4	E1.4	E3.4	E3.4						
E	CS1.5	CS1.5	E2.1	E2.1	E4.1	E4.1						
F	CS1.6	CS1.6	E2.2	E2.2	E4.2	E4.2						
G	CS1.7	CS1.7	E2.3	E2.3	E4.3	E4.3						
H	CS1.8	CS1.8	E2.4	E2.4	E4.4	E4.4						

Este ELISA se lleva a cabo con cada uno de los anticuerpos monoclonales de unión 5F7, 7C6, 10F11.

10 Procedimiento

1. Se agregan 100  $\mu$ l de solución de mAb por pocillo. Se incuba la placa de ELISA durante una noche a +6 °C (heladera).
- 15 2. Se decanta la solución de anticuerpo y se lavan los pocillos tres veces, cada una con 250  $\mu$ l de tampón de PBST.
3. Se agregan 250  $\mu$ l/pocillo de solución de bloqueo. Se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Se decanta la solución de bloqueo y se lavan los pocillos tres veces, cada vez con 250  $\mu$ l de tampón de PBST.
5. Se agregan 100  $\mu$ l/pocillo de cada referencia de calibración y los extractos de cerebro SDS/DTT. Se Incuba la placa durante 2 horas a temperatura ambiente, luego durante una noche a 6 °C.
- 20 6. Se decantan las referencias de calibración y las soluciones de extractos de cerebro SDS/DTT, y se lavan los pocillos tres veces, cada una con 250  $\mu$ l de tampón de PBST.
7. Se agregan 200  $\mu$ l/pocillo de solución de anticuerpo primario y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 25 8. Se decanta la solución de anticuerpo primario y se lavan los pocillos tres veces, cada una con 250  $\mu$ l de tampón de PBST.
9. Se agregan 200  $\mu$ l/pocillo de solución de anticuerpo secundario y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 30 10. Se decanta la solución de anticuerpo secundario y se lavan los pocillos tres veces, cada una con 250  $\mu$ l de tampón de PBST.
11. Se agregan 100  $\mu$ l/pocillo de solución de TMB.
12. Se controla el color de la placa durante el revelado (entre 5 y 15 minutos a temperatura ambiente) y se termina la reacción agregando 50  $\mu$ l/pocillo de solución de terminación cuando se ha revelado el color apropiado.
13. Se mide la D.O. a 450 nm.
14. Se calculan los resultados usando la calibración.
- 35 15. Evaluación: Si las extinciones de las muestras están más allá del rango de calibración lineal, se las diluye nuevamente y se repite.

Los resultados se ilustran en la Figura 10.

40 Niveles cerebrales de epítomos de globulómeros A $\beta$ (20-42) en extractos de cerebro de pacientes con EA y sujetos controles

Se usó un ELISA sándwich para investigar el contenido de epítomo de globulómero A $\beta$ (20-42) truncado en extractos de cerebro. Se usaron ELISA con anticuerpos respectivos contra el globulómero A $\beta$ (20-42) para la calibración.

45 La extracción de tejido cerebral con la enfermedad de Alzheimer demuestra que el contenido de epítomo de globulómero A $\beta$ (20-42) se halla significativamente elevado comparado con un paciente control. Esto demuestra que efectivamente el epítomo del globulómero A $\beta$ (20-42) es una especie de A $\beta$  de importancia en el cerebro con enfermedad de Alzheimer humana, y que no solamente es relevante para animales modelo con la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, los anticuerpos dirigidos contra el epítomo del globulómero A $\beta$ (20-42) son altamente deseables para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 12: Revelado del anti-globulómero A $\beta$ (20-42) en líneas celulares de hibridomas

55 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una

combinación de estas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando procedimientos de hibridomas que incluyen aquellos conocidos en la técnica y aquellos que se encuentran, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (dichas referencias incorporadas en el presente documento por referencia en su totalidad). El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente documentación, no se limita a los anticuerpos producidos con tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo que deriva de un clon individual, que incluye cualquier clon eucariota, procaríota o de fago, y no el método con el que se lo produce.

El protocolo particular que se usa para producir los anticuerpos que se describen en la presente documentación es como se indica a continuación:

Inmunización de ratones: se inmunizaron ratones Balb/c y A/J (entre 6 y 8 semanas de edad) por vía subcutánea con 50 µg de antígeno en CFA. Los animales se estimularon cada tres semanas con 50 µg de antígeno en Immuneasy™ (Qiagen) con un total de tres estímulos. Cuatro días antes de la fusión, los ratones se estimularon con 10 µg de antígeno en forma intravenosa.

Fusión celular y análisis de hibridomas: se fusionaron células de bazo de los animales inmunizados con células de mieloma SP2/0-Ag14 con una relación de 5:1 usando técnicas convencionales. Entre siete y diez días después de la fusión, cuando se observaron colonias macroscópicas, se evaluaron los SN con un ELISA para anticuerpos contra el globulímero Aβ(20-42). Las células de los pocillos positivos en el ELISA se escalaron y se clonaron con una dilución limitante.

Determinación del isotipo de anticuerpo: el isotipo de los mAb anti-globulímero Aβ(20-42) se determinó usando el conjunto de elementos para isotipificación Zymed EIA.

Escalado y purificación de anticuerpos monoclonales: Se expandieron los hibridomas en medio con 5 % de suero fetal bovino con baja IgG (Hyclone). El sobrenadante se cosechó y se concentró. El mAb se purificó usando cromatografía en Proteína A y se dializó en PBS.

Titulaciones de suero: se inmunizaron diez ratones con el globulímero Aβ(20-42). Todos los ratones se seroconvirtieron con títulos de ELISA (1/2 de DO Máx a 450 nm) de entre 1:5000 y 1:10000.

#### DESIGNACIONES DE HIBRIDOMAS QUE PRODUCEN ANTICUERPOS MONOCLONALES

Designaciones internas de Abbott Laboratories que se usan para los registros.

Líneas Celulares Registradas:

- 1) ML13-7C6.1D4.4A9.5G8 (también denominada en la presente documentación "7C6")
- 2) ML15-5F7.5B10 (también denominada en la presente documentación "5F7")
- 3) ML15-10F11.3D9 (también denominada en la presente documentación "10F11")
- 4) ML15-4B7.3A6 (también denominada en la presente documentación "4B7")
- 5) ML15-2F2.3E12 (también denominada en la presente documentación "2F2")
- 6) ML15-6A2.4B10 (también denominada en la presente documentación "6A2")
- 7) ML13-4D10.3F3 (también denominada en la presente documentación "4D10")
- 8) ML15-7E5.5E12 (también denominada en la presente documentación "7E5")
- 9) ML15-10C1.5C6.3H4 (también denominada en la presente documentación "10C1")
- 10) ML15-3B10.2D5.3F1 (también denominada en la presente documentación "3B10")

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott GmbH & Co.KG Abbott Laboratories

<120> Anticuerpos anti-globulímero aβ, porciones de unión a antígeno de estos, hibridomas correspondientes, ácidos nucleicos, vectores, células huésped, métodos para producir dichos anticuerpos, composiciones que comprenden dichos anticuerpos, usos de dichos anticuerpos y métodos para usar dichos anticuerpos

<130> M/46385

<150> US 60/740.866

<151> 28-11-2005

<150> US 60/779.171

<151> 03-03-2006

ES 2 527 661 T3

<150> US 60/787.361  
 <151> 30-03-2006

5 <150> US 60/842.400  
 <151> 05-09-2006

<160> 42

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> VH ML15-5F7

20 <400> 1

<b>cagg</b>	<b>tccagc</b>	<b>tgaagcagtc</b>	<b>tggagctgag</b>	<b>ctggtgaggc</b>	<b>ctgggacttc</b>	<b>agtgaagatg</b>	<b>60</b>
<b>tctctgcaagg</b>	<b>cttctggcta</b>	<b>caccttact</b>	<b>accttctata</b>	<b>tacactgggt</b>	<b>gaagcagagg</b>		<b>120</b>
<b>cctggacagg</b>	<b>gccttgagtg</b>	<b>gattggaatg</b>	<b>attggtcctg</b>	<b>gaagtggtaa</b>	<b>tacttactac</b>		<b>180</b>
<b>aatgagatgt</b>	<b>tcaaggacaa</b>	<b>ggccacattg</b>	<b>actgtagaca</b>	<b>catcctccag</b>	<b>cacagcctac</b>		<b>240</b>
<b>atgcagctca</b>	<b>gcagcctcac</b>	<b>atctgaggac</b>	<b>tctgcggtct</b>	<b>atctctgtgc</b>	<b>aagagcaaag</b>		<b>300</b>
<b>tcagctcggg</b>	<b>cggcctgggt</b>	<b>tgcttactgg</b>	<b>ggccaagggg</b>	<b>ctctggtcac</b>	<b>tgctctgca</b>		<b>360</b>

<210> 2  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> VL ML15-5F7

30 <400> 2

<b>gatgttttga</b>	<b>tgacccaaac</b>	<b>tccactctcc</b>	<b>ctgcctgtca</b>	<b>gtcttggaga</b>	<b>tcaagcctcc</b>	<b>60</b>
<b>atctcttga</b>	<b>gatctagtca</b>	<b>gagcgttga</b>	<b>cagagtaatg</b>	<b>gaaacaccta</b>	<b>tttagaatgg</b>	<b>120</b>
<b>tacctgcaga</b>	<b>aaccaggcca</b>	<b>gtctccaaag</b>	<b>ctcctgatct</b>	<b>acaaagtctc</b>	<b>caaccgattt</b>	<b>180</b>
<b>tctggggtcc</b>	<b>cagacagggt</b>	<b>cagtggcagt</b>	<b>ggatcagggg</b>	<b>cagatttcac</b>	<b>actcaagatc</b>	<b>240</b>
<b>agcagagtgg</b>	<b>aggctgagga</b>	<b>tctgggagtt</b>	<b>tattactgct</b>	<b>ttcaaggctc</b>	<b>acatgttctc</b>	<b>300</b>
<b>cccacgttcg</b>	<b>gaggggggac</b>	<b>caagctggaa</b>	<b>ataaaacgg</b>			<b>339</b>

35 <210> 3  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> VH ML15-5F7

45 <400> 3



ES 2 527 661 T3

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe  
 20 25 30

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

Gly Met Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Lys Ser Ala Arg Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 4  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> VL ML15-5F7

10

<400> 4

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

ES 2 527 661 T3

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

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

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

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

Arg

5 <210> 5  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-10F11  
 <400> 5

cagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcaactgggt gaagcagagg 120  
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat atttatacctt acaatgatgg tactaagtac 180  
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagtatat 240  
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctacagtct attactgtac agtagagggt 300  
 gctacctggg acgggtactt cgatgtctgg ggcacaggga ccacgggtcac cgtctcctca 360

15 <210> 6  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-10F11  
 <400> 6

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca atcagcctct 60

ES 2 527 661 T3

```

atctcttgca agtcaagtca ggcctctta tatagtaaag gaaaaaccta tttgaattgg      120
ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactc atctggtgtc taaactggac      180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg tgcaagggtac acattttcct      300
cacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg                               339

```

5 <210> 7  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-10F11  
 <400> 7

```

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20           25           30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50           55           60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65           70           75           80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Thr Val Glu Gly Ala Thr Trp Asp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

15 <210> 8  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-10F11  
 <400> 8

ES 2 527 661 T3

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

Arg

5 <210> 9  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML13-7C6

<400> 9

gaagtgaagc tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
 tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120  
 ccagcgaaga ggctagagtg ggtcgcgtcc attcataata gaggtactat cttctatcta 180  
 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacac cctgtacctg 240  
 caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatatatt actgtacaag aggccggagt 300  
 aactcctatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcg 354

15 <210> 10  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML13-7C6

<400> 10

ES 2 527 661 T3

```

gatgttttgg tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ggcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgcc gatctactca gacccttgta catogtaatg gagacaccta tttagaatgg     120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag tcctgatct acaaagtttc caaccgattt     180
tctgggggtcc cagacagggt cagcggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc     240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg     300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg                               339

```

5 <210> 11  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML13-7C6  
 <400> 11

```

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

```

15 <210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML13-7C6  
 <400> 12

ES 2 527 661 T3

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

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

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

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

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

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

Arg

5 <210> 13  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-4B7

<400> 13

gagggtgaagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgqagc ctggaggctc ccggaaactc 60  
 tectgtgcag cctctggatt cacttctcagt gactacgaaa tgggtgtgggt tcgacaggct 120  
 ccaggggagg ggctggagtg ggttgcatac attagtagtg gcagtcgtac catccaactat 180  
 gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaagaa cacctgttc 240  
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta 300  
 ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccatc tcacagtctc ctca 354

15 <210> 14  
 <211> 342  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-4B7

<400> 14

ES 2 527 661 T3

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctactgtgt cagttggaga gaaggttact 60  
 atgagctgca ggtccagtca gagccttttc tataggagca atcaaaagaa cttcttggcc 120  
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctctt aaactgctga tttactgggc atccactagg 180  
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggg agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300  
 ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

5 <210> 15  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-4B7

<400> 15

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

15 <210> 16  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-4B7

<400> 16

ES 2 527 661 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg  
 20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

Lys Arg

5 <210> 17  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-2F2

<400> 17

caggctccagc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaggc ctgggacttc agtgaagatg 60  
 tcttgcaagg cttctggcta caccttcaact accttctata tacactgggt gaagcagagg 120  
 cctggacagg gccttgagtg gattggaatg attggtcctg gaagtggtaa tacttactac 180  
 aatgagatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca gcagcctcac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagcaaag 300  
 tcagctcggg cggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360

15 <210> 18  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-2F2

<400> 18



ES 2 527 661 T3

gatgttttga tgacccaaac tocactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagcgttgta cagagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttctt 300  
 cccacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaaacgg 339

5 <210> 19  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-2F2  
 <400> 19

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

15 <210> 20  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-2F2  
 <400> 20

ES 2 527 661 T3

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

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

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

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

Arg

5 <210> 21  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-6A2  
 <400> 21

cagggtccagc tgcagcagtc tggagctgag ctgggtgagc ctgggacttc agtgaagatg 60  
 tctctgcaagg cttctggcta caccttcaact accttctata tacactgggt gaggcagagg 120  
 cctggacagg gccttgagtg gattggaatg attggtcctg gaagtggtaa tacttactac 180  
 aatgagatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca gcagcctcac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagcaaag 300  
 tcacatcggg cggcctgggt tgcttactgg ggccaagga ctctgggtcac tgtctctgca 360

15 <210> 22  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-6A2  
 <400> 22

ES 2 527 661 T3

```

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagcgttgta cagagtaatg gaaacaccta tttagaatgg     120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt     180
tttgggggtcc cagacagggt cagtggcagt agatcagga cagatttcac actcaagatc     240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttctc     300
cccacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaacgg                             339

```

5 <210> 23  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-6A2

<400> 23

```

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

```

15 <210> 24  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-6A2

<400> 24

ES 2 527 661 T3

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

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

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

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

Arg

Arg

5 <210> 25  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML13-4D10

<400> 25

cagggtgcagc tgaagcagtc aggacctagc ctaatacagc cctcacagag cctgtccata 60  
 acctgcacag tctctggttt ctcatctaac agctatggtg tacactgggt tcgccagtct 120  
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagag gtggaaggat agactataat 180  
 gcagctttca tgtccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240  
 aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacact gccatatact actgtgccag aaactccgat 300  
 gtctggggca cagggaccac ggtcaccgtc tctctca 336

15 <210> 26  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML13-4D10

<400> 26

ES 2 527 661 T3

```

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggta ccattggaca accagcctcc      60
atctcttgca agtcaagtca gaggctctta gatattgatg gaaagacata tttgaattgg    120
ttgttacaga ggccaggcca gtctcceaag cgctaatct atctggtgtc taaactggac    180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc    240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttccg    300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg                          339

```

5 <210> 27  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML13-4D10  
 <400> 27

```

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20          25          30

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50          55          60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100         105         110

```

15 <210> 28  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML13-4D10  
 <400> 28

ES 2 527 661 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

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

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

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

Arg

5 <210> 29  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-7E5  
 <400> 29

gaggtgaagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggctc ccggaaactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacgaaa tgggtgtgggt tcgacaggct 120  
 ccaggggagg ggctggagtg ggttgcatatc attagtagtg gcagtcgtac catccactat 180  
 gcagacacag tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgttc 240  
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta 300  
 ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccatc tcacagtctc ctca 354

15 <210> 30  
 <211> 342  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-7E5  
 <400> 30

ES 2 527 661 T3

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctactgtgt cagttggaga gaaggttact 60  
atgagctgca ggtccagtc gagccttttc tataggagca atcaaaagaa cttcttgcc 120  
tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180  
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300  
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

5 <210> 31  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> VH ML15-7E5  
<400> 31

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

15 <210> 32  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> VL ML15-7E5  
<400> 32

ES 2 527 661 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg  
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg

5 <210> 33  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> VH ML15-10C1

<400> 33

gaggtgaagc tgggtggagtc tgggggaggt ttagtgcagc ctggaggctc ccggaaactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacgaaa tgggtgtgggt tgcacaggct 120  
ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcatac attaatagtg gcagtgggtac catccactat 180  
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tcagagaca atccaagaa caccctgttc 240  
ctgcaaatga gcagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta 300  
ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccattc tcaactgtctc ctca 354

15 <210> 34  
<211> 342  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> VL ML15-10C1

<400> 34



ES 2 527 661 T3

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctactgtgt cagttggaga gaaggttact 60  
 atgagctgca agtccagtc gagccttttc tatagtcgca atcaaaagaa cttcttgccc 120  
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactggg 180  
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300  
 ccgtggacgt tcgggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

5 <210> 35  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-10C1

<400> 35

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

15 <210> 36  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VL ML15-10C1

<400> 36

ES 2 527 661 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser  
 20 25 30

Arg Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Gly Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Phe Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

Lys Arg

5 <210> 37  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> VH ML15-3B10

<400> 37

caggctccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcttgcaagg cttctggata cacattcaact gactatgtta tacactgggt gaagcagaag 120  
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactcagtac 180  
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagtctac 240  
 atggagctca gcagctctgac ctctgaggac tctacagtct actactgtac agtagagggt 300  
 ggtacctggg acgggtatctt cgatgtctgg ggcacagga ccacgggtcac cgtctcctca 360

15 <210> 38  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> VH ML15-3B10

<400> 38

ES 2 527 661 T3

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

<210> 39  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Región constante de Ig gamma-1

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

5

10

ES 2 527 661 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

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

ES 2 527 661 T3

290

295

300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 40  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> mutante de región constante de Ig gamma-1

10

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

ES 2 527 661 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 41  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> región constante de Ig Kappa

10

<400> 41

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45

ES 2 527 661 T3

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 42

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región constante de Ig Lambda

<400> 42

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30

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

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

5

10

15

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que comprende una cadena variable pesada (VH) y ligera (VL) en el que los dominios de CDR de cadena variable pesada y ligera comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en los siguientes conjuntos de CDR:

Conjunto de CDR 1	Secuencia de Aminoácidos
VH CDR-H1	SYGVH
VH CDR-H2	VIWRGGRIDYNAAFMS
VH CDR-H3	NSDV
VL CDR-L1	KSSQSLLDIDGKTYLN
VL CDR-L2	LVSKLDS
VL CDR-L3	WQGTHFPYT
<b>Conjunto de CDR 2</b>	
VH CDR-H1	SYVMH
VH CDR-H2	YIYPYNDGTYNEKFKG
VH CDR-H3	TVEGATWDGYFDV
VL CDR-L1	KSSQSLLYSKGKTYLN
VL CDR-L2	LVSKLDS
VL CDR-L3	VQGTHFPHT
<b>Conjunto de CDR 3</b>	
VH CDR-H1	SYAMS
VH CDR-H2	SIHNRGTIFYLDSVKG
VH CDR-H3	GRSNSYAMDY
VL CDR-L1	RSTQTLVHRNGDTYLE
VL CDR-L2	KVSNRFS
VL CDR-L3	FQGSHVPYT
<b>Conjunto de CDR 4</b>	
VH CDR-H1	TFYIH
VH CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD
VH CDR-H3	AKSARAAWFAY
VL CDR-L1	RSSQSWQSNCNTYLE
VL CDR-L2	KVSNRFS
VL CDR-L3	FQGSHVPPT
<b>Conjunto de CDR 5</b>	
VH CDR-H1	TFYIH
VH CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD
VH CDR-H3	AKSARAAWFAX
VL CDR-L1	RSSQSVVQSNNGNTYLE
VL CDR-L2	KVSNRFS
VL CDR-L3	FQGSHVPPT
<b>Conjunto de CDR 6</b>	
VH CDR-H1	TFYIH
VH CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD
VH CDR-H3	AKSHRAAWFAY
VL CDR-L1	RSSQSVVQSNNGNTYLE
VL CDR-L2	KVSNRFF
VL CDR-L3	FQGSHVPPT
<b>Conjunto de CDR 7</b>	
VH CDR-H1	DYEMV
VH CDR-H2	YINSGSGTIHYADTVKG
VH CDR-H3	TLLRLHFDY
VL CDR-L1	KSSQSLFYSRNQKNFLA
VL CDR-L2	WASTGES
VL CDR-L3	QQYFSYPWT
<b>Conjunto de CDR 8</b>	
VH CDR-H1	DYEMV
VH CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG
VH CDR-H3	TLLRLHFDY
VL CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA
VL CDR-L2	WASTRES



VL CDR-L3	QQYYSYPWT
<b>Conjunto de CDR 9</b>	
VH CDR-H1	DYEMV
VH CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG
VH CDR-H3	TLLRLHFDY
VL CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA
VL CDR-L2	WASTRES
VL CDR-L3	QQYYSYPWT
<b>Conjunto de CDR 10</b>	
VH CDR-H1	DYVIH
VH CDR-H2	YINPYNDGTQYNEKFKG
VH CDR-H3	VEGGTWDGYFDV
VL CDR-L1	Secuencia de aminoácidos de VL CDR-L1 del anticuerpo monoclonal que puede obtenerse de un hibridoma designado por el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7851
VL CDR-L2	Secuencia de aminoácidos de VL CDR-L2 del anticuerpo monoclonal que puede obtenerse de un hibridoma designado por el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7851
VL CDR-L3	Secuencia de aminoácidos de VL CDR-L3 del anticuerpo monoclonal que puede obtenerse de un hibridoma designado por el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-7851

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es humanizado.
3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, donde el anticuerpo comprende una región constante humana.
- 5 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo posee un patrón de glucosilación humano.
- 10 5. Porción de unión a antígeno de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. La porción de unión a antígeno de la reivindicación 5, donde la porción es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento Fv monocatenario del anticuerpo.
- 15 7. Ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Vector que comprende un ácido nucleico aislado de la reivindicación 7.
- 20 9. Célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 8.
10. Método para producir un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar una célula huésped de la reivindicación 9 en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir el anticuerpo.
- 25 11. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.
12. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento o prevención, o diagnóstico de una amiloidosis, tal como enfermedad de Alzheimer o síndrome de Down.
- 30 13. Método para diagnosticar una amiloidosis, tal como enfermedad de Alzheimer o síndrome de Down, que comprende proporcionar una muestra del sujeto sospechoso de padecer una amiloidosis, poner en contacto la muestra con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y detectar la formación de un complejo que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno con un antígeno, donde la presencia del complejo indica una amiloidosis en el sujeto.
- 35

FIG. 1

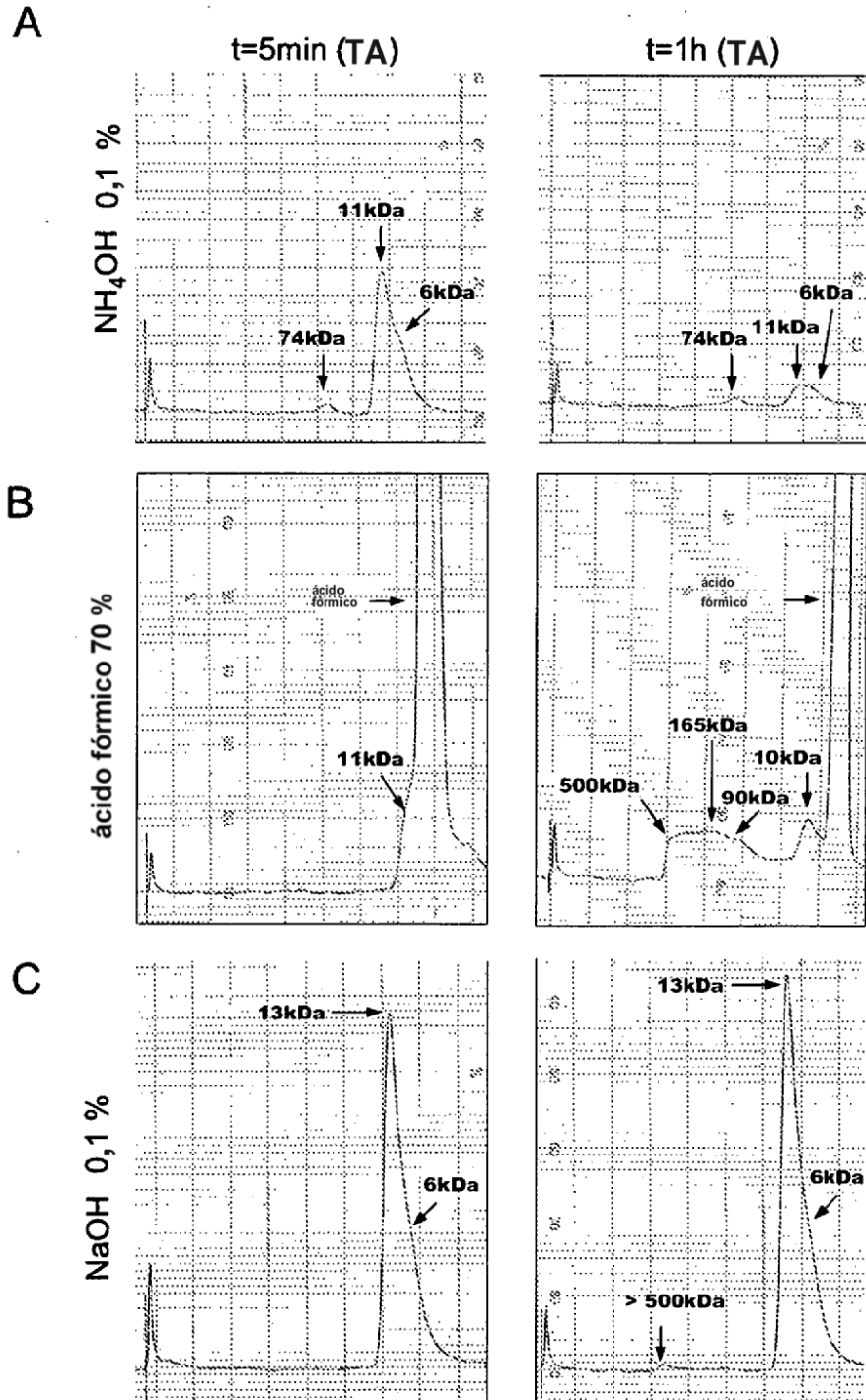


FIG. 1

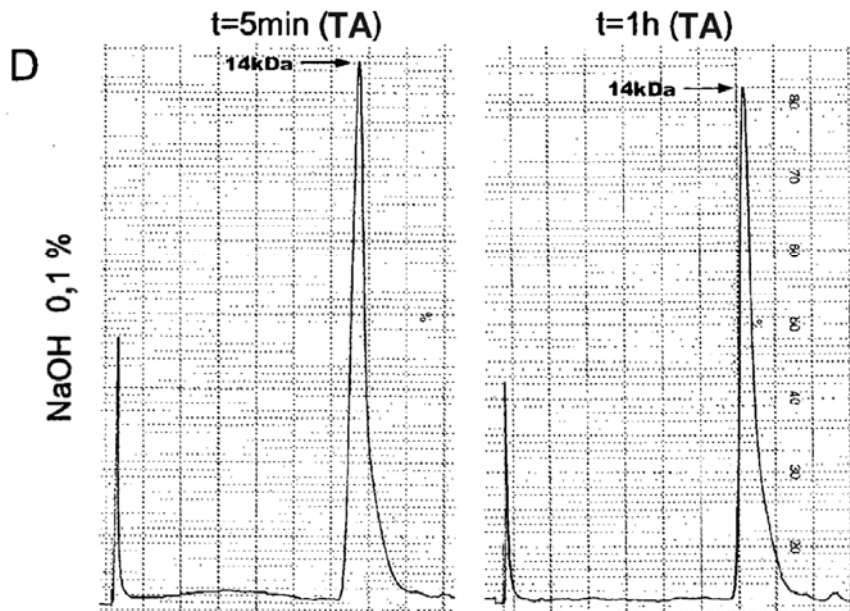
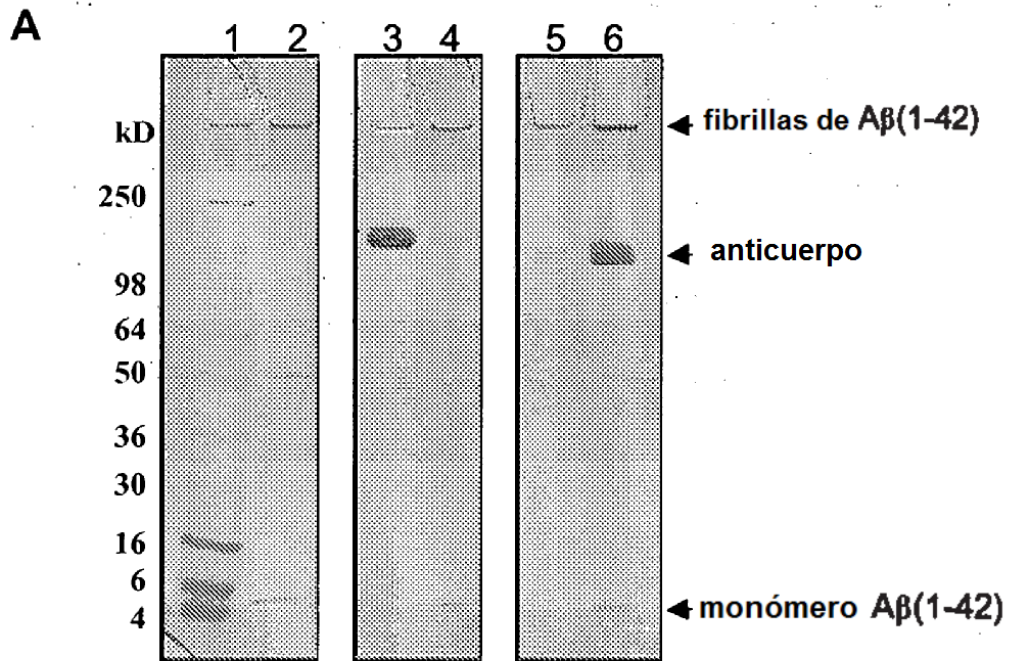


FIG. 2



**B**

	anticuerpo unido a fibrillas [%]
6E10	98
5F7	7
2F2	15
6A2	22
4D10	6
10F11	7
3B10	5
7C6	2
7E5	3
10C1	5

FIG. 3

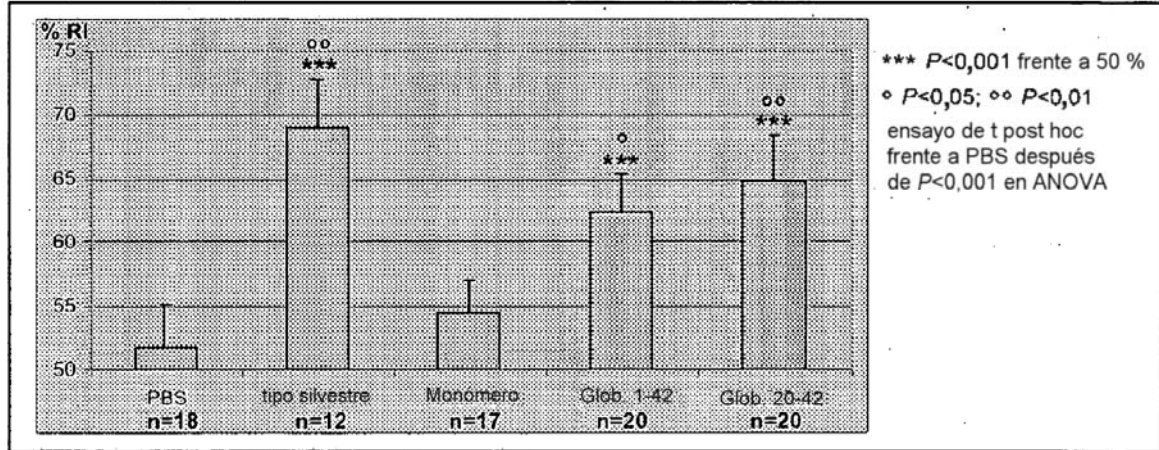


FIG. 4

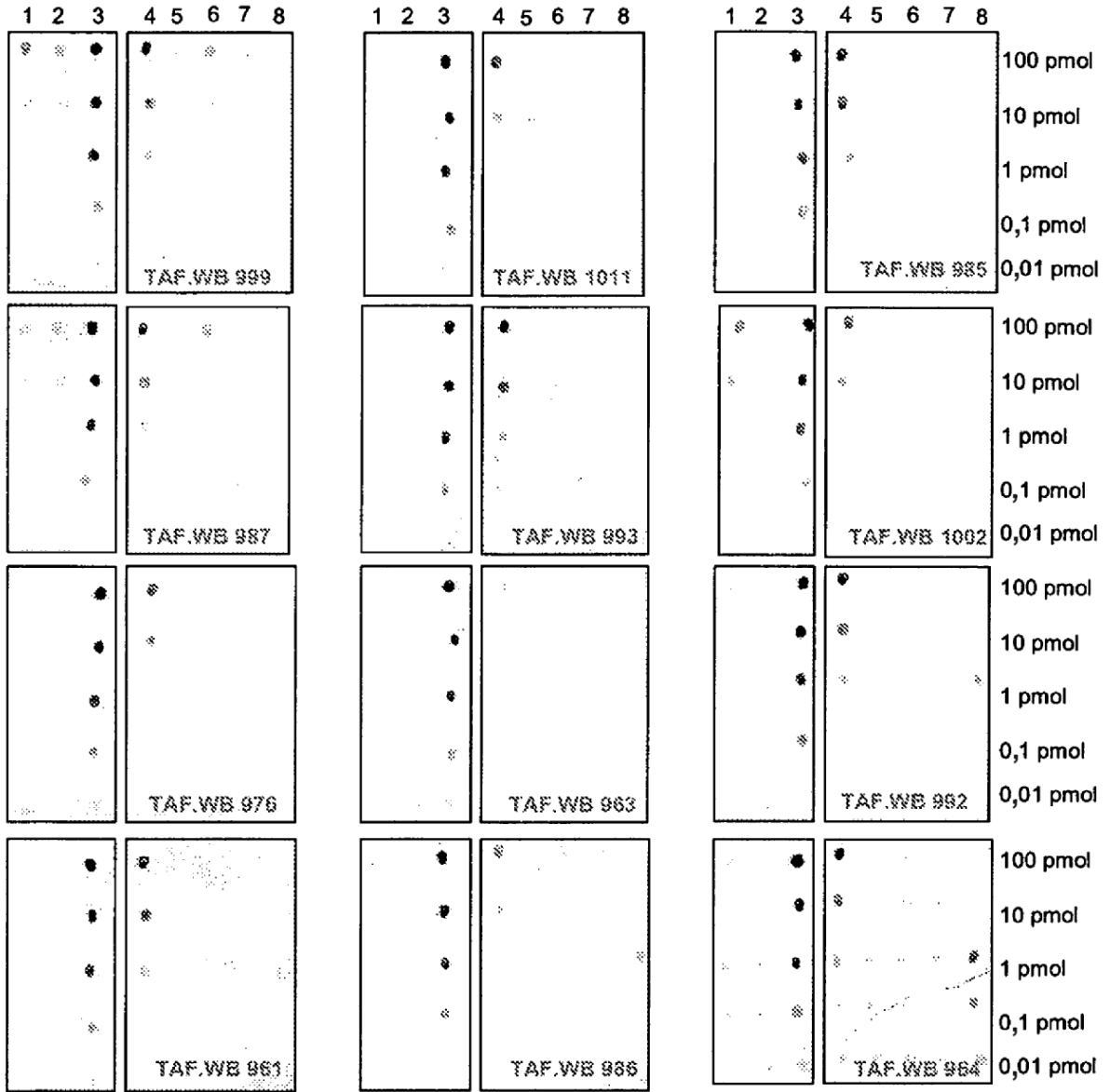


FIG. 5

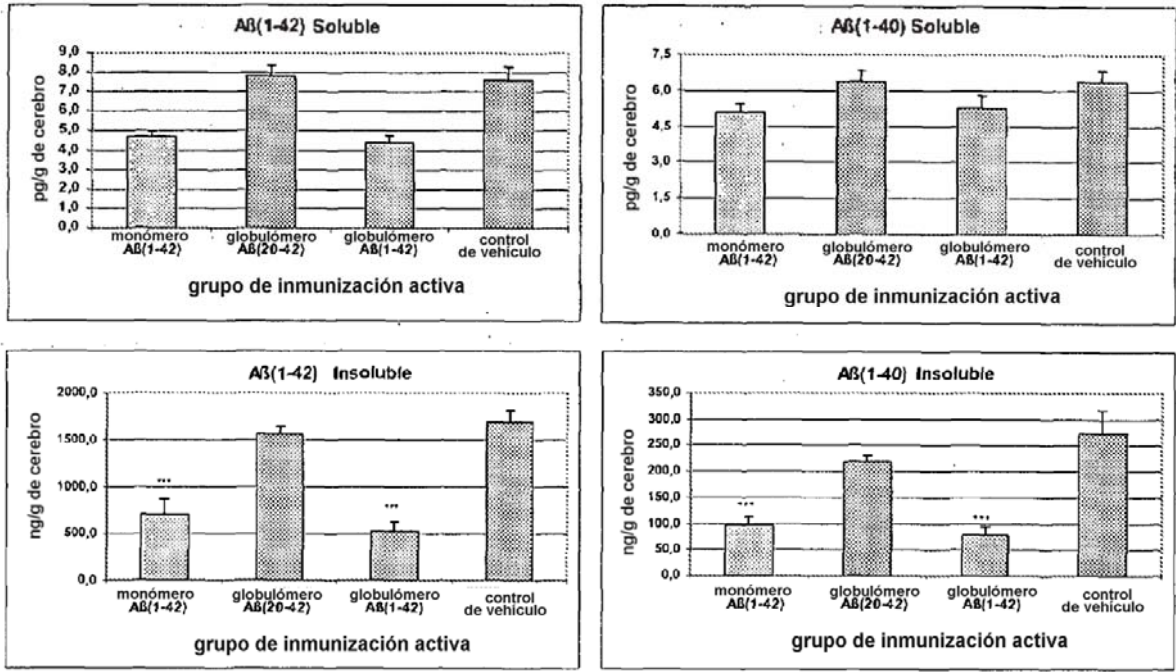




FIG. 6

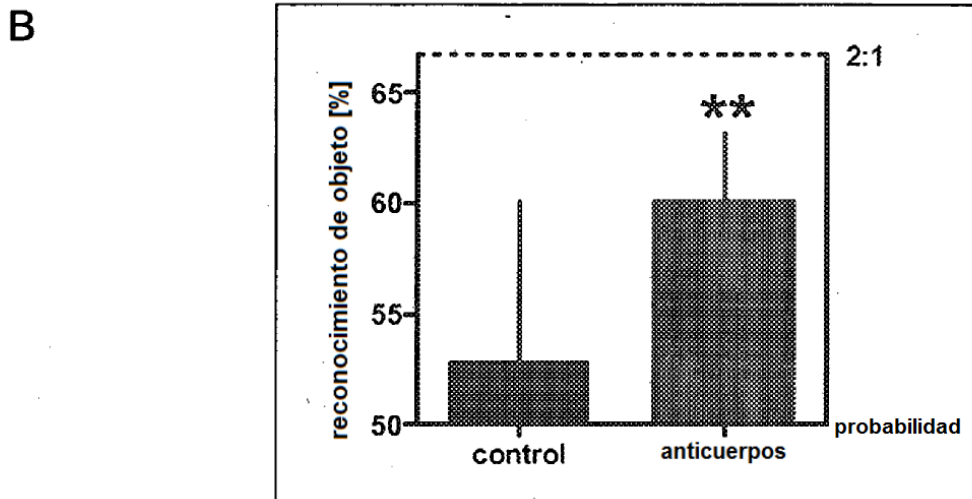
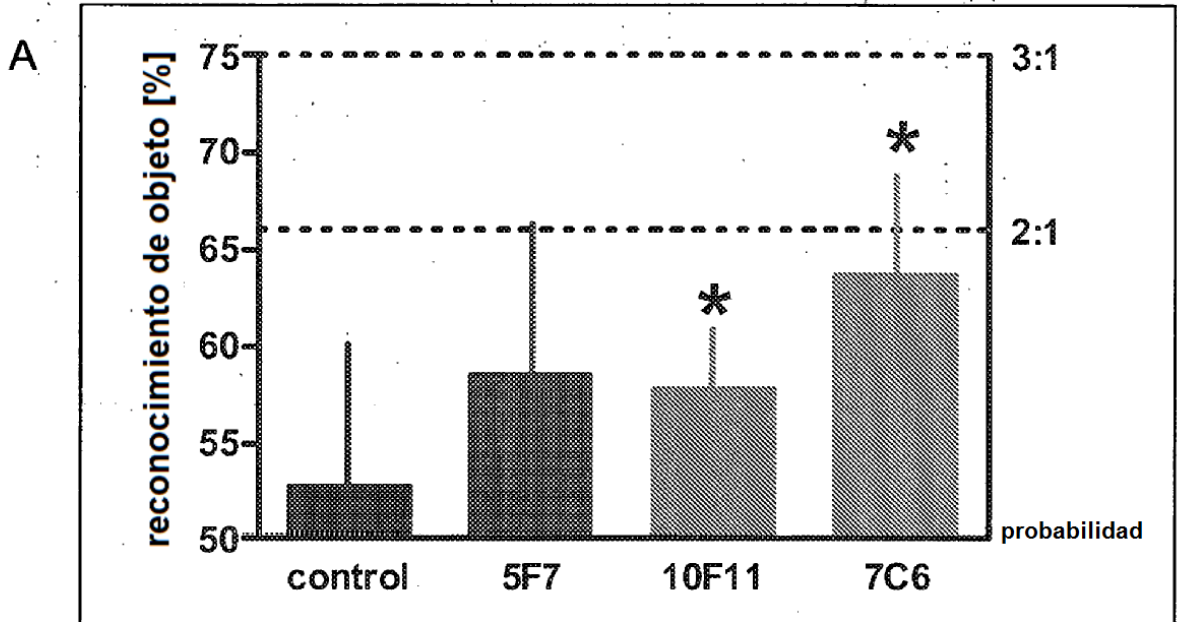
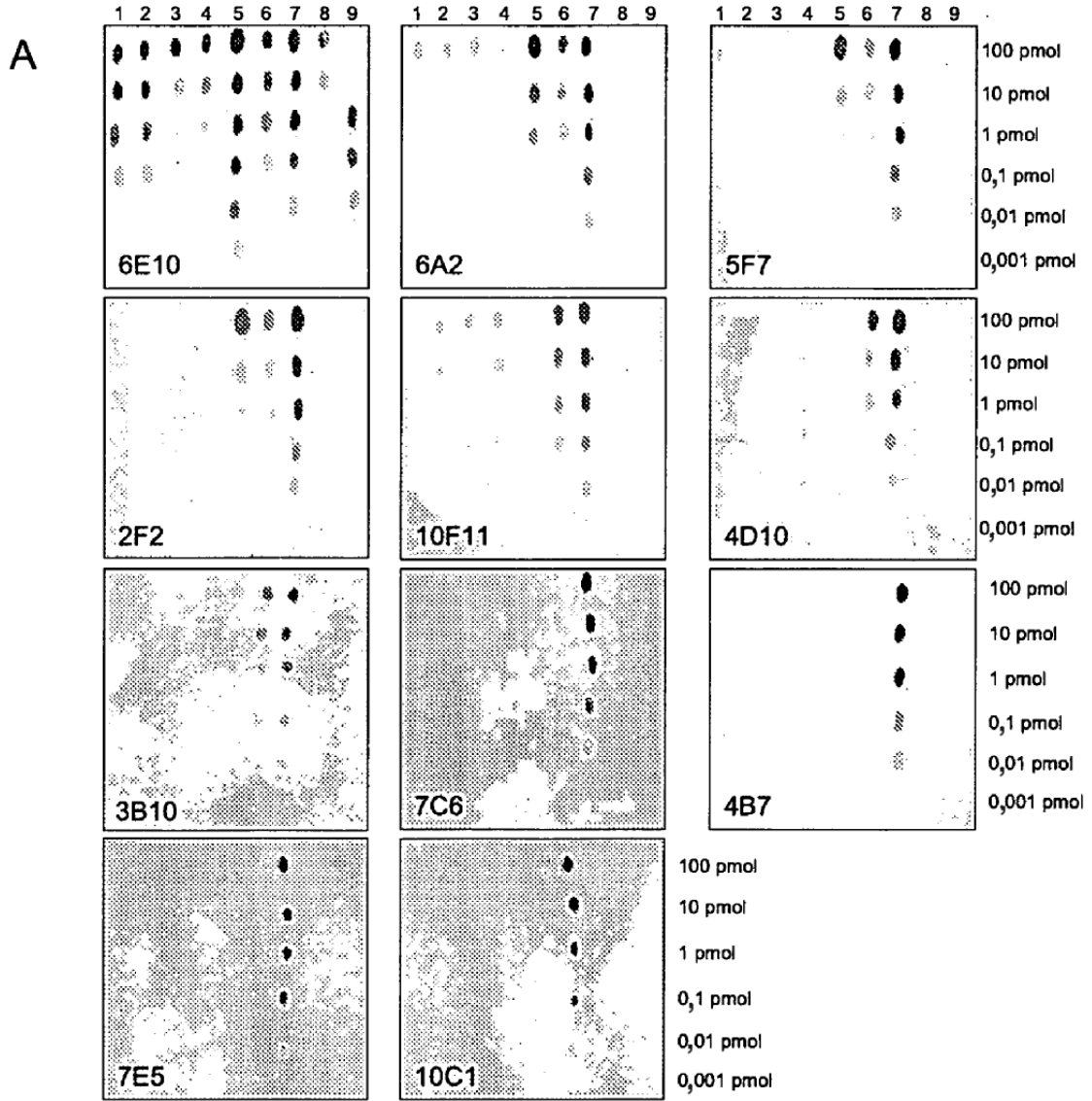




FIG. 7



**B**

	monómero Aβ(1-42) NH <sub>4</sub> OH 0,1 %	monómero Aβ(1-40) NH <sub>4</sub> OH 0,1 %	monómero Aβ(1-42) NaOH 0,1 %	monómero Aβ(1-40) NaOH 0,1 %	globulómero Aβ(1-42)	globulómero Aβ(12-42)	globulómero Aβ(20-42)	fibrilla Aβ(1-42)	sAPPα
6E10	10	17	505	322	0,2	9	1	510	0,3
6A2	7 840	5 078	7 717	38 583	47	138	1	337 931	> 1 000
5F7	26 955	> 10 000	23 455	164 182	226	242	1	> 10 000	> 100
2F2	36 827	> 10 000	> 10 000	> 10 000	195	274	1	> 10 000	> 100
10F11	83 267	3 719	17 417	2 233	77 985	12	1	294 365	> 1 000
4D10	> 10 000	43 535	> 10 000	35 069	> 10 000	29	1	> 10 000	> 100
3B10	16 364	22 500	45 000	> 10 000	30 000	14	1	> 10 000	> 100
7C6	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	94 052	> 100 000	1	> 100 000	> 1 000
4B7	> 100 000	> 457 971	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	1	> 100 000	> 1 000
7E5	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	1	> 100 000	> 1 000
10C1	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	40 000	> 100 000	1	> 100 000	> 1 000

FIG. 8

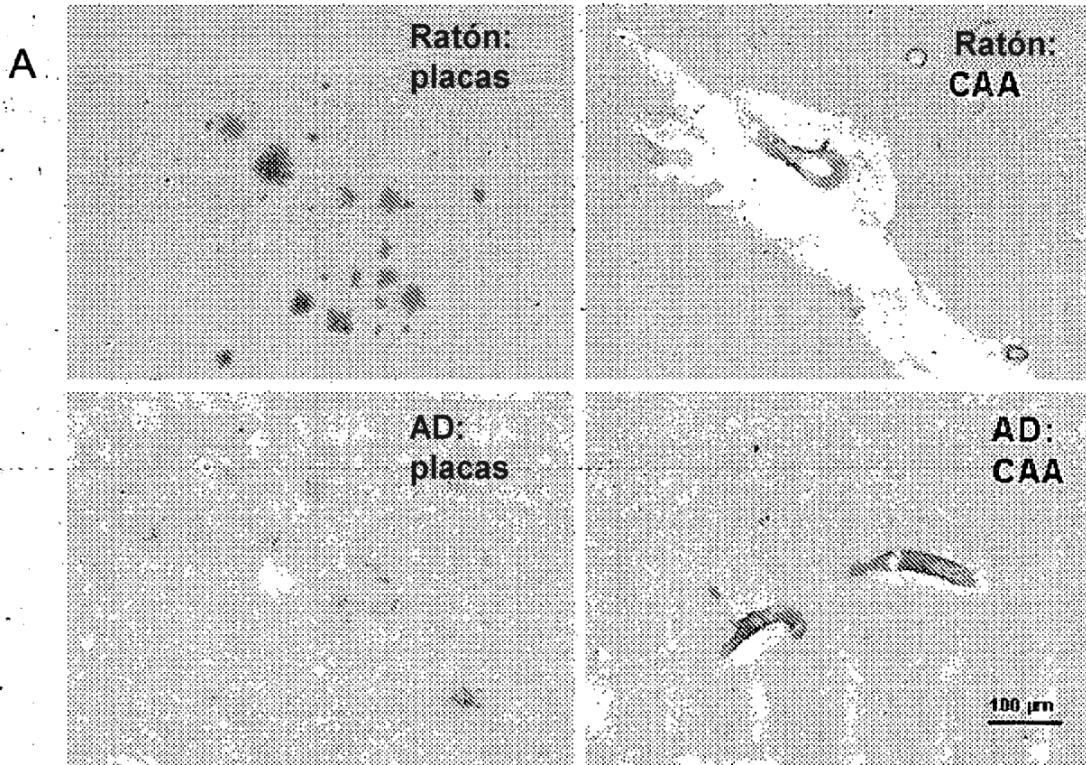


FIG. 8

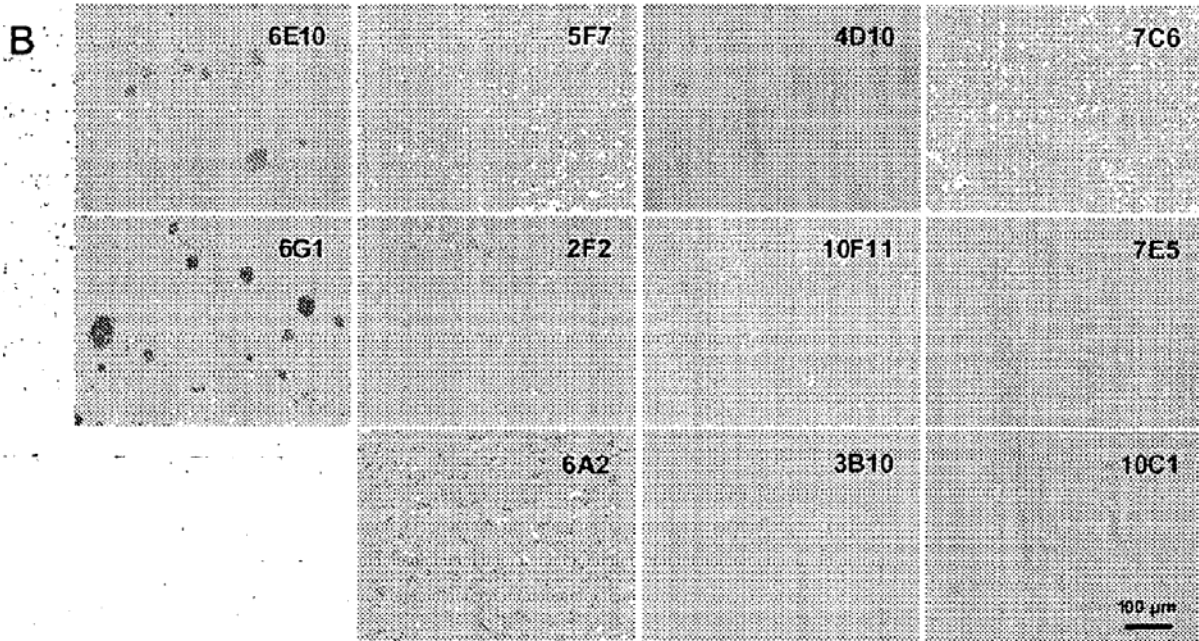


FIG. 8

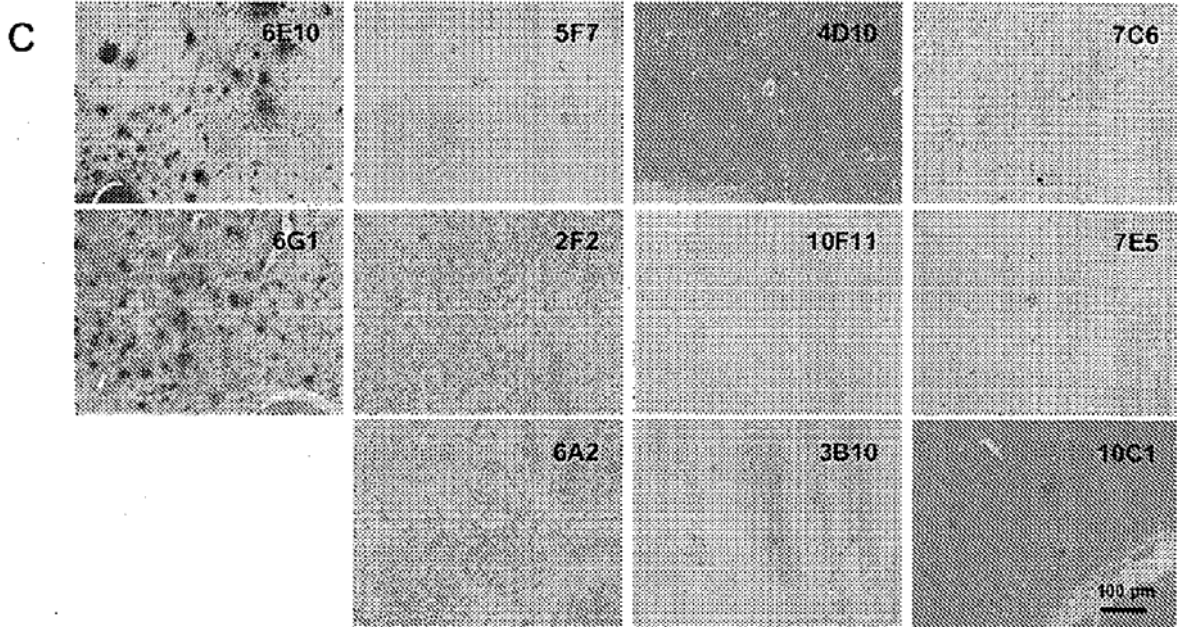
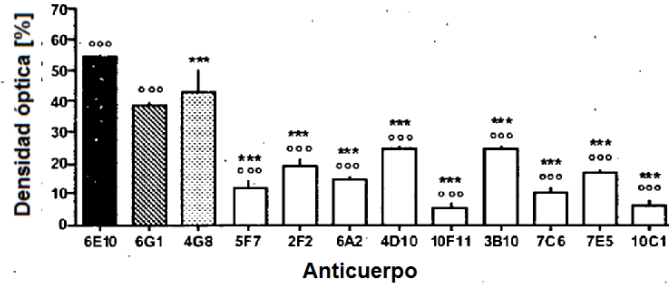
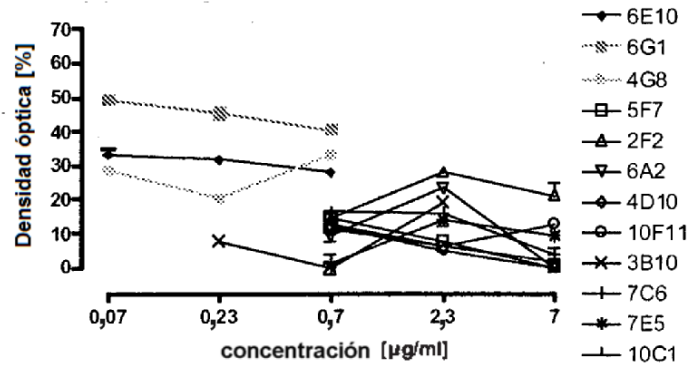


FIG. 8 (D-H)

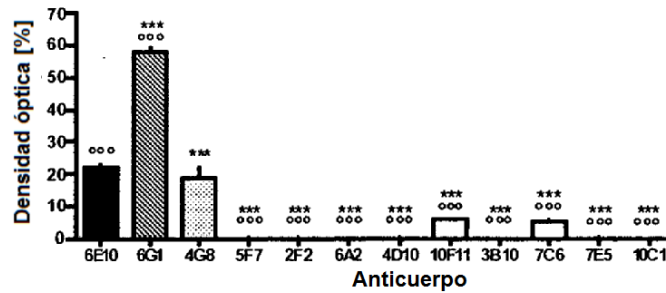
(D) Unión con placas amiloides en Tg2576



(E) Unión con placas amiloides en APP/L



(F) Unión con placas amiloides en AD(RZ55)



(G) Unión con placas amiloides en AD (RZ16)

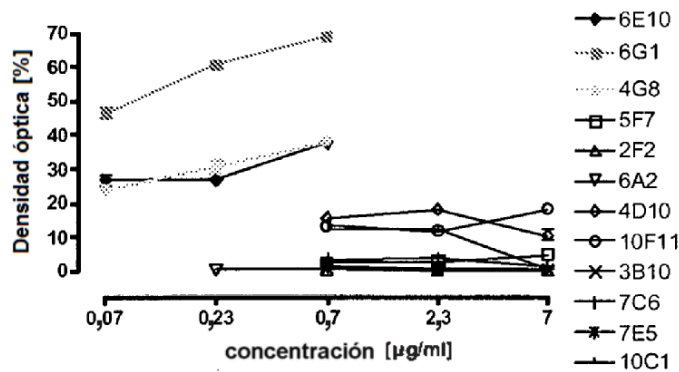


FIG. 8

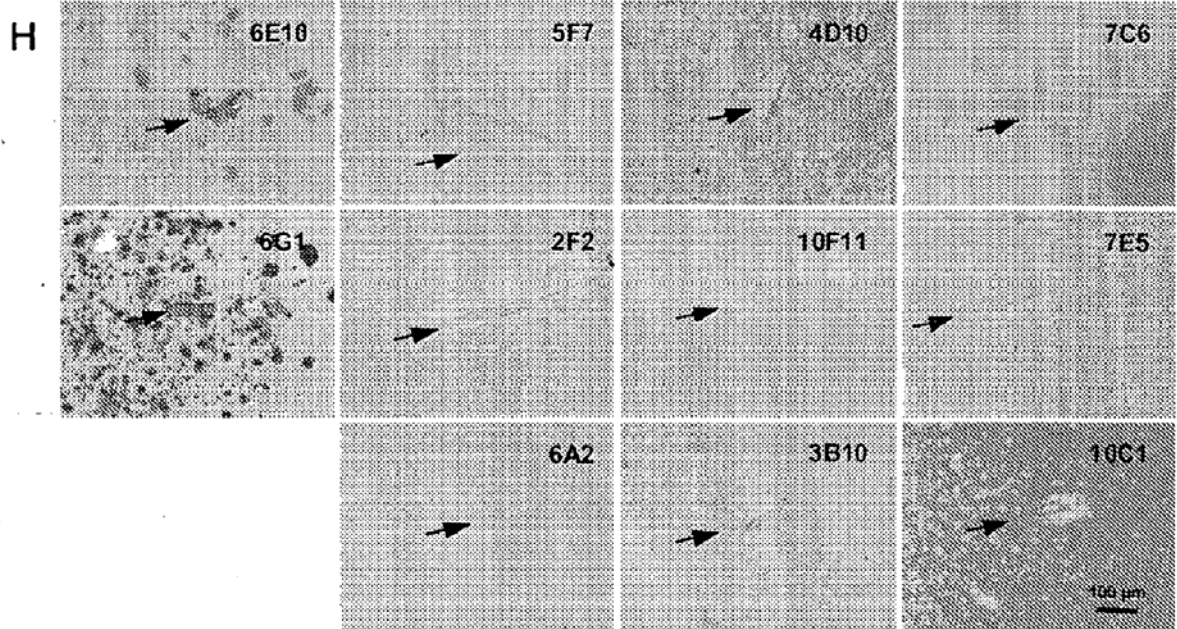




FIG. 9

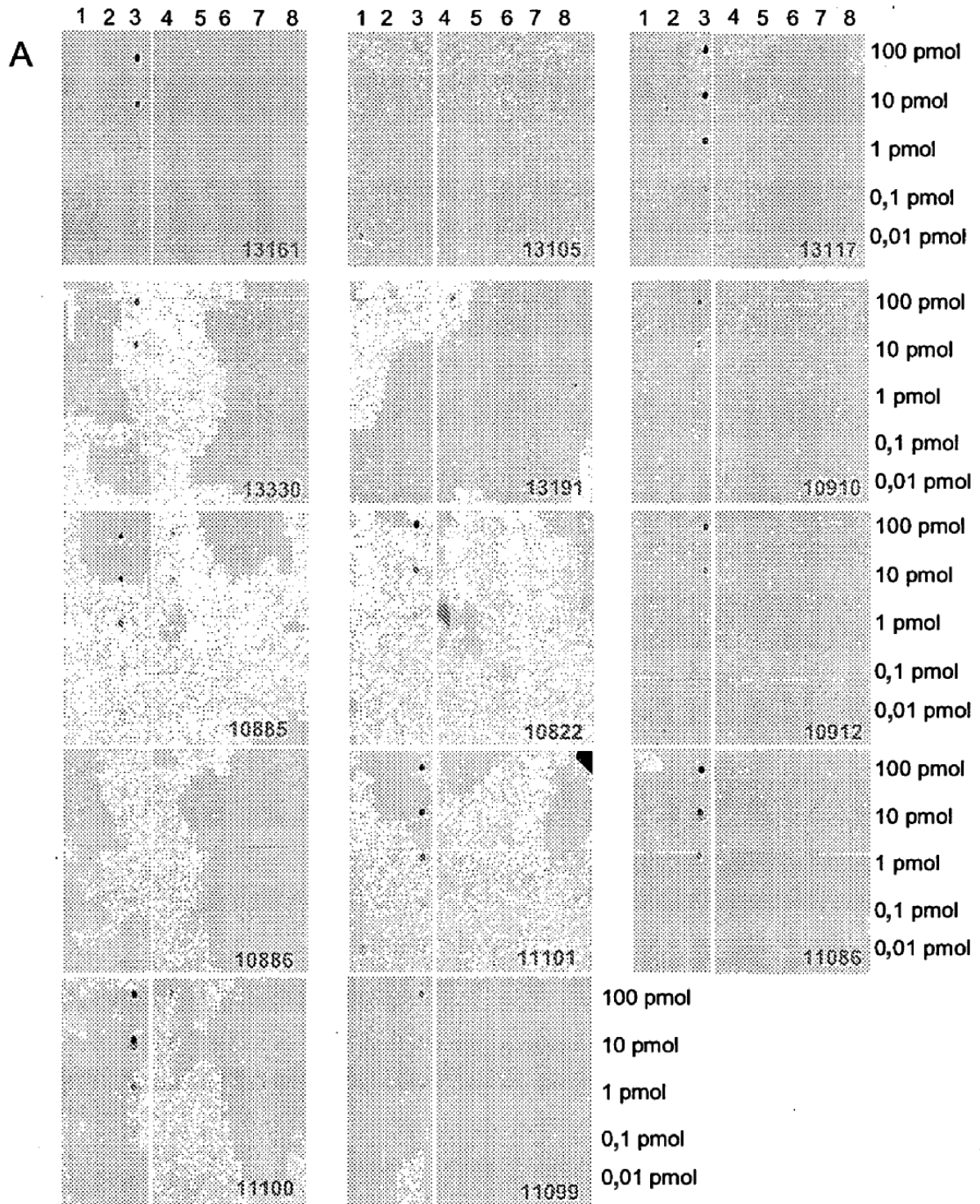






FIG. 9

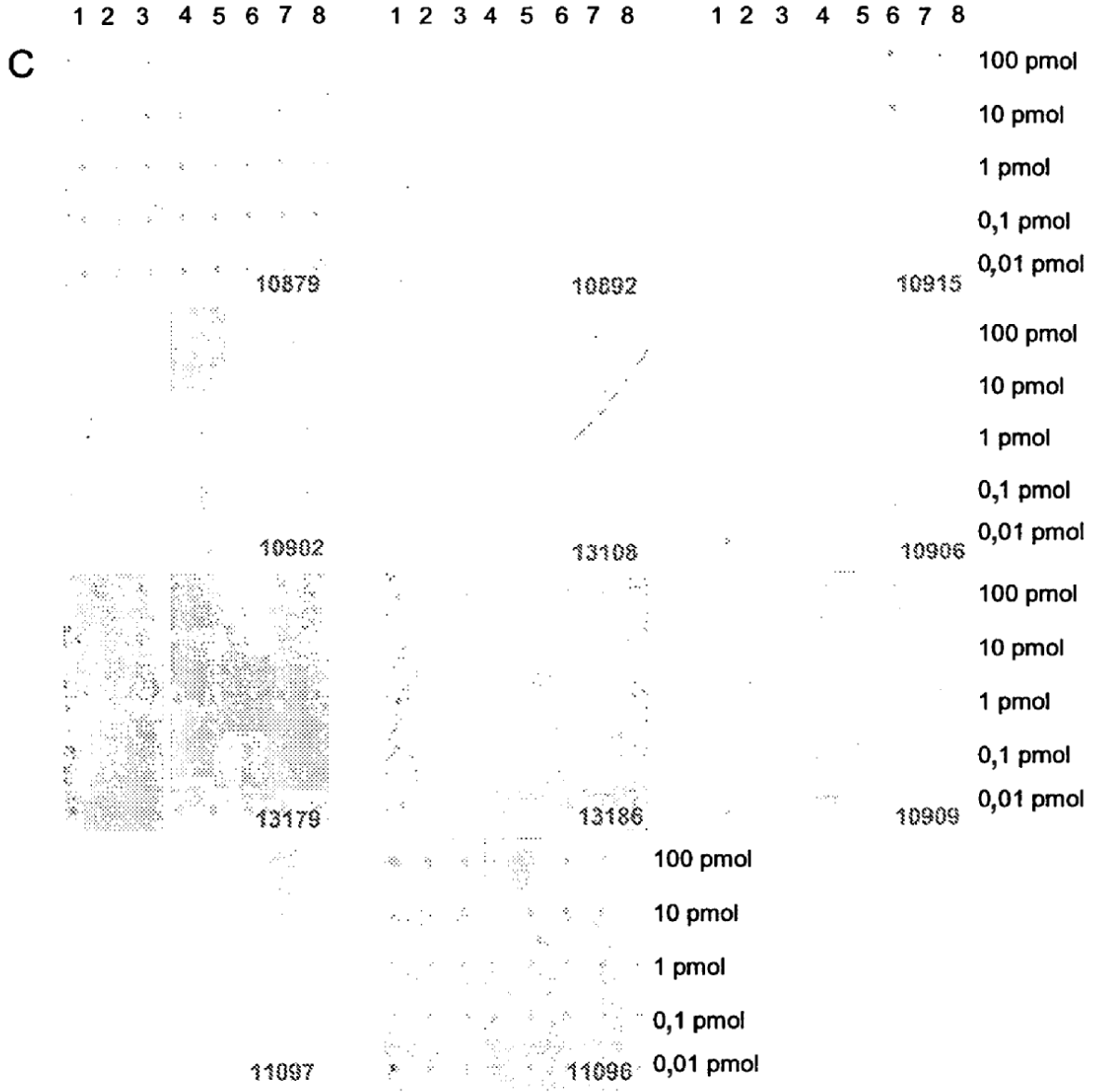


FIG. 9

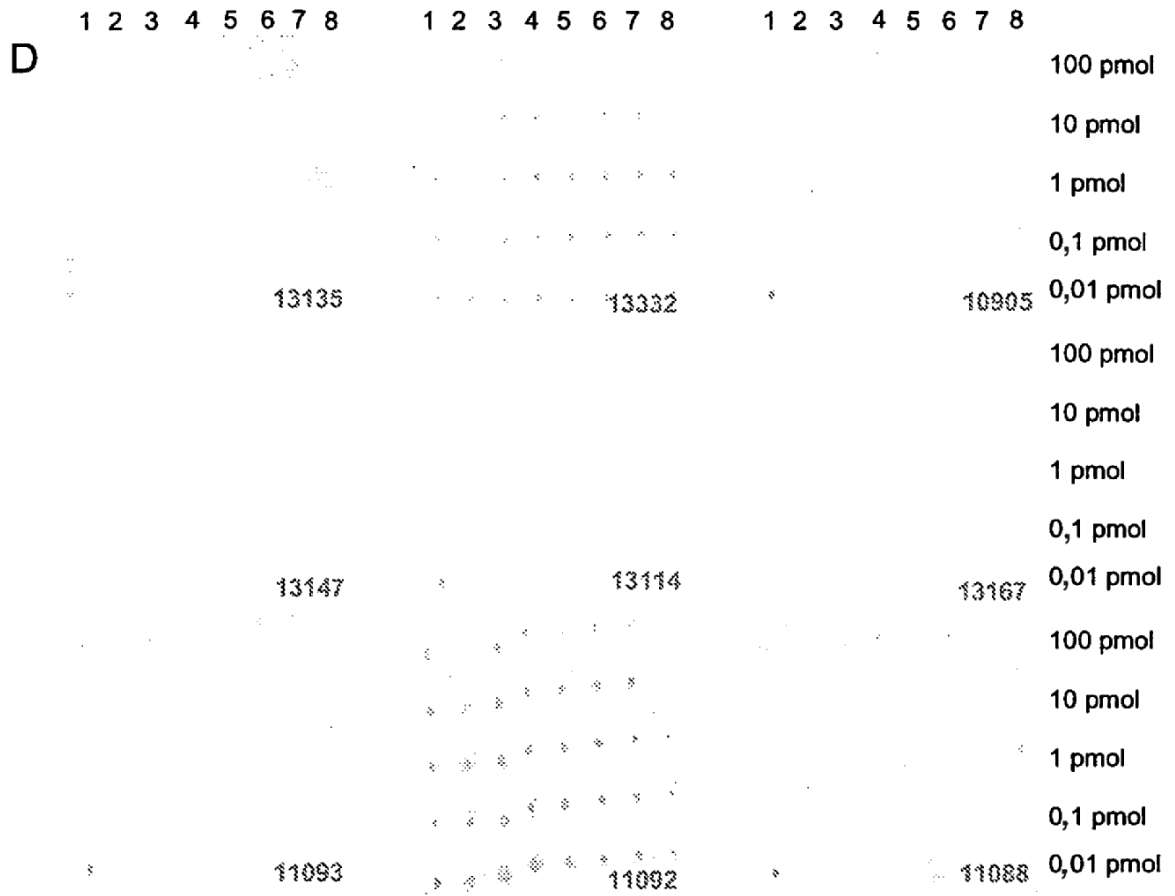


FIG. 10

	<b>7C6 -&gt;BA199 globulómero A<math>\beta</math>(20-42) [pmol/g] tejido cerebral</b>	<b>10F11-&gt;BA199 globulómero A<math>\beta</math>(20-42) [pmol/g] tejido cerebral</b>	<b>5F7 -&gt;BA199 globulómero A<math>\beta</math>(20-42) [pmol/g] tejido cerebral</b>
<b>RZ16 (AD)</b>	<b>50,1</b>	<b>10,6</b>	<b>10,2</b>
<b>RZ 52 (AD)</b>	<b>43,9</b>	<b>14,3</b>	<b>13,9</b>
<b>RZ 55 (AD)</b>	<b>13,9</b>	<b>2,9</b>	<b>3,6</b>
<b>RZ 92 (control)</b>	<b>&lt; 0,2</b>	<b>&lt; 0,06</b>	<b>&lt; 0,06</b>

**FIG. 11**

**A1) VH ML15-5F7**

SEC ID N°: 1

CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC  
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT  
ACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG  
ATTGGTCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA  
GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA  
GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG  
TCAGCTCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC  
TGTCTCTGCA

SEC ID N°: 3

QVQLKQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVKQRPGQGLEWIGMI  
GPGSNTYYNEMFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSAR  
AAWFAYWGQGLVTVSA

**A2) VL ML15-5F7**

SEC ID N°: 2

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT  
CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG  
AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC  
TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA  
GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGA  
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCTCC  
CACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEC ID N°: 4

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGG  
TKLEIKR

**B1) VH ML15-10F11**

SEC ID N°: 5

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC  
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTCTATGTTAT  
GCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA  
TTTATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG  
GCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGTATATATGGAGCTCAG  
CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTACAGTCTATTACTGTACAGTAGAGGGTG  
CTACCTGGGACGGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACC  
GTCTCCTCA

SEC ID N°: 7

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQRPGQGLEWIGYI  
YPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTVYMESSLTSEDSTVYYCTVEGATW  
DGYFDVWGTGTTVTVSS

**B2) VL ML15-10F11**

SEC ID N°: 6

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTACCATTGGACAA  
TCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAAAGGA  
AAAACCTATTTGAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCG  
CCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTTAC  
TGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAG  
GCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCTCAC  
ACGTTCTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAACGG

SEC ID N°: 8

DVVMTQTPLTSLVTIGQSASISCKSSQSLLYSKGKTYLNWLLQRPGQSPKRLI  
YLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHTFPHTFGG  
GTKLEIKR

**C1) VH ML13-7C6**

SEC ID N°: 9

GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGT  
CCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCA  
TGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGCGAAGAGGCTAGAGTGGGTTCGCGTCC  
ATTCATAATAGAGGTAATCTTCTATCTAGACAGTGTGAAGGGCCGATTC  
ACCATCTCCAGAGATAATGTCAGGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAG  
TCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATATATTACTGTACAAGAGGGCCGGAGTA  
ACTCCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCT  
CG

SEC ID N°: 11

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPAKRLEWVASIH  
NRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNTLYLQMSSLRSEDTAIYYCTRGRSNSYAM  
DYWGQGTSVTVSS

**C2) VL ML13-7C6**

SEC ID N°: 10

GATGTTTTGGTGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGGCTTGGAGAT  
CAAGCCTCCATCTCTTGCCGATCTACTCAGACCCTTGACATCGTAATGGA  
GACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTC  
CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAG  
CGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG  
GCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTAC  
ACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAACGG

SEC ID N°: 12

DVLVTQSPLSLPVRLGDAQISCRSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPKSLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKLEIKR

D1) VH ML15-4B7

SEC ID N°: 13

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC  
CCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTACGAAAT  
GGTGTGGGTTTCGACAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATACA  
TTAGTAGTGGCAGTCGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA  
TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCCCTGCAAATGAG  
CAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC  
TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACAGTCTCCT  
CA

SEC ID N°: 15

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGEGLEWVAYI  
SSGSRTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDAMYYCARTLLRLH  
FDYWGQGTILT VSS

D2) VL ML15-4B7

SEC ID N°: 14

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG  
AAGGTTACTATGAGCTGCAGGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGGAGCAA  
TCAAAAGA ACTTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTA  
AACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCT  
TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTG  
AAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCC  
GTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEC ID N°: 16

DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCRSSQSLFYRSNOKNFLAWYQQKPGQSPKL  
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVKAEDLAVYYCQYYSYPTFG  
GGTKLEIKR

E1) VH ML15-2F2

SEC ID N°: 17

CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC  
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT  
ACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG  
ATTGGTCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA  
GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA  
GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG  
TCAGCTCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC  
TGTCTCTGCA

SEC ID N°: 19

QVQLKQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVKQRPGQGLEWIGMI  
GPGSGNTYYNEMFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSAR  
AAWFAYWGQGLVTVSA

E2) VL ML15-2F2

SEC ID N°: 18

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT  
CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG  
AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC  
TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA  
GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGA  
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCC  
CACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEC ID N°: 20

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVOSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGG  
TKLEIKR



**F1) VH ML15-6A2**

SEC ID N°: 21

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC  
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT  
ACACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG  
ATTGGTCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA  
GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA  
GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG  
TCACATCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC  
TGTCTCTGCA

SEC ID N°: 23

QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVRQRPGGLEWIGMI  
GP GSGNTYYNEMFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSHR  
AAWFAYWGQGLVTVSA

**F2) VL ML15-6A2**

SEC ID N°: 22

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT  
CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG  
AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC  
TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTTTTGGGGTCCCAGACAGGTTCA  
GTGGCAGTAGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGA  
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCCTCC  
CACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAACGG

SEC ID N°: 24

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI  
YKVSNRFFGVPDRFSGSRSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGG  
TKLEIKR

**G1) VH ML13-4D10**

SEC ID N°: 25

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTAGCCTAATACAGCCCTCACAGAG  
CCTGTCCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAGCTATGGTGT  
ACACTGGGTTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGA  
TATGGAGAGGTGGAAGGATAGACTATAATGCAGCTTTCATGTCCAGACTG  
AGCATCACCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAG  
TCTGCAAGCTGATGACACTGCCATATACTACTGTGCCAGAACTCCGATG  
TCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEC ID N°: 27

QVQLKQSGPSLIQPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWR  
GGRIDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNSDVWGT  
GTTVTVSS

**G2) VL ML13-4D10**

SEC ID N°: 26

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCCGGTTACCATTGGACAA  
CCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATATTGATGGA  
AAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCG  
CCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTTAC  
TGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAG  
GCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTCCGTAC  
ACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEC ID N°: 28

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDIDGKTYLNWLLQRPQSPKRLIY  
LVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGFHPYTFGGG  
TKLEIKR

**H1) VH ML15-7E5**

SEC ID N°: 29

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC  
CCGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTACGAAAT  
GGTGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAGTGGGTTCATACA  
TTAGTAGTGGCAGTCGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGG  
TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCCCTGCAAATGAG  
CAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC  
TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACAGTCTCCT  
CA

SEC ID N°: 31

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSDYEMVWVRQAPGEGLEWVAYI  
SSGSRTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDAMYYCARTLLRLH  
FDYWGQGTILTVSS

**H2) VL ML15-7E5**

SEC ID N°: 30

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG  
AAGGTTACTATGAGCTGCAGGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGGAGCAA  
TCAAAGAAGTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTA  
AACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCT  
TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTG  
AAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGCAATATTATAGCTATCC  
GTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEC ID N°: 32

DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCRSSQSLFYRSNOKNFLAWYQQKPGQSPKL  
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQYYSPWTFG  
GGTKLEIKR

**I1) VH ML15-10C1**

SEC ID N°: 33

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC  
CCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTACGAAAT  
GGTGTGGGTTTCGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATACA  
TTAATAGTGGCAGTGGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA  
TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCTCTGCAAATGAG  
CAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC  
TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACTGTCTCCT  
CA

SEC ID N°: 35

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVAYI  
NSGSGTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDAMYYCARTLLRLH  
FDYWGQGTILT VSS

**I2) VL ML15-10C1**

SEC ID N°: 34

GACATTGTGATGTCAACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG  
AAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGTCGCAAT  
CAAAGAACTTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCGTAA  
ACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTGGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTT  
CACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGA  
AGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTTTAGCTATCCGT  
GGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEC ID N°: 36

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSOSLFYSRNQKNFLAWYQQKPGQSPKL  
LIYWASTGESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCOQYFSYPWTFG  
GGTKLEIKR

J1) VH ML15-3B10

SEC ID N°: 37

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC  
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTATGTTAT  
ACACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA  
TTAATCCTTACAATGATGGTACTCAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG  
GCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGTCTACATGGAGCTCAG  
CAGTCTGACCTCTGAGGACTCTACAGTCTACTACTGTACAGTAGAGGGTG  
GTACCTGGGACGGGTATTTGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACC  
GTCTCCTCA

SEC ID N°: 38

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVIHWVKQKPGQGLEWIGYI  
NPYNDGTOYNEKFKGKATLTSKSSSTVYMELSSLTSEDSTVYYCTVEGGTW  
DGYFDVWGTGTTVTVSS