

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 641**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2008 E 08713652 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2121754**

54 Título: **Amiloide beta Fab pegilado**

30 Prioridad:

**18.01.2007 US 885439 P**

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

**13.05.2015**

73 Titular/es:

**ELI LILLY & COMPANY (100.0%)  
LILLY CORPORATE CENTER  
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**BALES, KELLY RENEE;  
BUMOL, THOMAS FRANK;  
CHOW, CHI-KIN;  
DEMATTOS, RONALD BRADLEY;  
HANSEN, RYAN JOHN;  
KUCHIBHOTLA, UMA;  
LU, JIRONG y  
MCDONNELL, PETER COLON**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 535 641 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

Amiloide beta Fab pegilado.

La presente invención se refiere a un fragmento de anticuerpo que se une al péptido amiloide beta (A $\beta$ ) y se une covalentemente a una o más moléculas de polietilenglicol (PEG).

5 El péptido A $\beta$  en forma circulante, está compuesto por 39-43 aminoácidos (mayoritariamente 40 o 42 aminoácidos) que resulta de la escisión de una proteína precursora, la proteína precursora de amiloide (APP). La conversión de la forma de A $\beta$  soluble a insoluble con alto contenido de hojas- $\beta$  y su depósito como placas neuríticas y cerebrovasculares en el cerebro parece que se asocia con varias afecciones y enfermedades, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, y angiopatía amiloide cerebral (CAA). La prevención y/o inversión del depósito de A $\beta$  puede tratar afecciones asociadas con el péptido A $\beta$ .

Los agentes terapéuticos que afectan el depósito de A $\beta$  incluyen los anticuerpos contra el péptido A $\beta$ , tal como los anticuerpos humanizados y fragmentos que se tratan en los documentos WO 2001/62801, WO 2004/071408 y Tamura, Y., y col, Neurobiol. of Dis. (2005) 20:541-545.

15 El documento US 2006/257396A instruye sobre los anticuerpos humanizados que son específicos para el amiloide beta (A $\beta$ ) humano y describe la PEGilación de estos anticuerpos o fragmentos para prolongar su vida.

El documento WO 2004/071408 instruye sobre variantes humanizadas del anticuerpo monoclonal murino 266 para el tratamiento del Alzheimer.

20 Chapman, Andrew P: "PEGylated antibodies and antibody fragment for improved therapy: A review", 20020617, vol. 54, n° 54, n° 4, 17 June 2002 (17-06-2002), páginas 531-545, XP001199533, describe los beneficios de la PEGilación de anticuerpos.

El documento WO 2006/040153A instruye sobre nanocuerpos que se unen a A $\beta$  y se pueden PEGilar uniéndose a un molécula de PEG por la cadena pesada.

25 Mientras que muchos anticuerpos y sus derivados pueden ser útiles en el diagnóstico y la terapia, a menudo no se consiguen las características farmacocinéticas ideales de los anticuerpos para una aplicación en particular. Los anticuerpos terapéuticos que ayudan a combatir varias afecciones y enfermedades asociadas con el péptido A $\beta$  son generalmente inmunoglobulinas con regiones Fc intactas. Las regiones Fc son responsables de prolongar la semivida del anticuerpo en el plasma. Esta prolongación, sin embargo, puede ser una desventaja ya que evita que el anticuerpo que está unido al péptido diana no se aclare eficazmente, dando lugar a que el complejo antígeno anticuerpo esté presente en el plasma en circulación durante periodos de tiempo prolongados. La administración posterior del anticuerpo da lugar a una mayor acumulación del complejo no deseado en el plasma. La parte Fc de un anticuerpo puede tener ciertas funciones efectoras no deseadas y puede ser necesaria la eliminación de tales funciones. Además, la parte Fc añade un tamaño sustancial al agente terapéutico total lo que a menudo crea problemas asociados con la vía de suministro, dispositivos de suministro, y procesos de fabricación a gran escala.

30 Los fragmentos de anticuerpo sin la parte Fc, incluyendo Fab, se han estudiado *in vivo* para determinar si tales fragmentos pueden ser agentes terapéuticos potenciales. Los estudios sugieren, sin embargo, que la utilidad de las terapias que implican fragmentos tales como Fab es limitada debido a una tasa de aclaramiento rápida y una semivida corta. Por lo tanto, existe la necesidad de una molécula de anticuerpo anti-péptido A $\beta$  terapéuticamente activa con características farmacocinéticas y farmacodinámicas que permitan un mejor régimen de dosificación mientras que evite los potenciales efectos secundarios que se pueden crear por la formación de complejos en el plasma y las potenciales funciones efectoras.

35 La presente invención supera varios problemas asociados con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo terapéuticos que pueden dirigirse al péptido A $\beta$ . Los compuestos de la presente invención engloban un fragmento de anticuerpo que se unen al A $\beta$  y se unen covalentemente a una o más moléculas de polietilenglicol (PEG). Estos compuestos se pueden producir en sistemas bacterianos o de levaduras lo que elimina varios problemas asociados con la producción de anticuerpos en líneas celulares de mamíferos tales como los problemas de coste, problemas de purificación, y problemas de contaminación con antígenos producidos endógenamente. Además, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía subcutánea y tienen un perfil farmacocinético (PK) y farmacodinámico (PD) ideales, a la vez que conservan la afinidad y selectividad de los fragmentos de anticuerpo contra el A $\beta$ .

50 De una manera bastante impredecible e inesperada, los solicitantes también descubrieron que la unión covalente de moléculas de PEG a la región determinante de complementariedad (CDR) del fragmento de anticuerpo no alteraba la actividad, afinidad o selectividad del fragmento de anticuerpo contra el A $\beta$ .

La presente invención proporciona una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente al péptido A $\beta$  humano entre las posiciones de aminoácidos 13-28, en la que el fragmento de

anticuerpo se une covalentemente a una molécula de PEG.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo Fab que se une específicamente al péptido Aβ humano entre las posiciones de aminoácidos 13 a 28, en la que el fragmento de anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera de la SEC ID N° 1 y una región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2, y en la que dicho fragmento de anticuerpo Fab se une covalentemente a una molécula de polietilenglicol de 20 kD en la cisteína del aminoácido 56 de la SEC ID N° 2. Preferentemente, la molécula de polietilenglicol se une por medio de un enlace maleimida.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de acuerdo con la presente invención para su uso como un medicamento. Preferentemente, la molécula es para su uso en el tratamiento o prevención de una afección asociada con la actividad del péptido Aβ.

Más preferentemente, la molécula de acuerdo con la presente invención es para su uso en el tratamiento o prevención de una afección que se selecciona de entre la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y angiopatía amiloide cerebral (CAA).

Incluso más preferentemente, la molécula de acuerdo con la presente invención es para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer pre-clínica.

De manera alternativa, la molécula de acuerdo con la presente invención, es para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer clínica.

De acuerdo con un aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición que comprende la molécula de la presente invención. Preferentemente, la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable que es adecuado para su administración subcutánea.

En una realización, la divulgación proporciona una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en la que la región variable de la cadena ligera comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: CDRL1: **SSSQSLIYSDGNAYLH** (SEC ID N° 6), CDRL2 : **KVSNRFS** (SEC ID N° 7) y CDRL3: **TQSTHSPWT** (SEC ID N° 8) y en la que la región variable de la cadena pesada comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: CDRH1: **GYTFSRYSMS** (SEC ID N° 9), CDRH2: **QINIRGCNTYYPDVKG** (SEC ID N° 10) o **QINIRGNNTYYPDVKG** (SEC ID N° 11), y CDRH3: **GDF** (SEC ID N° 12). Preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que se une covalentemente o bien a la región variable de la cadena pesada o a la región variable de la cadena ligera del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que se une covalentemente a una región CDR. Incluso más preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que se une covalentemente a un resto de cisteína en la CDR. Más preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que se une covalentemente a una CDRH2: **QINIRGCNTYYPDVKG** (SEC ID N° 10) de la región variable de la cadena pesada del fragmento de anticuerpo.

En otra realización, la divulgación proporciona una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo que tiene una región variable de la cadena ligera de la SEC ID N° 1, y una región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2. Preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que está unida covalentemente o bien a la región variable de la la cadena pesada o a la región variable de la la cadena ligera del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, tal molécula tiene una molécula PEG que se une covalentemente a una CDR de la región variable de la cadena pesada del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que se une covalentemente a un resto de cisteína en la CDR de una región variable de la cadena pesada del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que se une covalentemente al resto de cisteína en la posición 56 de la región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2.

En otra realización, la divulgación proporciona una molécula que comprende un fragmento Fab o un fragmento scFv, en que el fragmento Fab o fragmento scFv se une covalentemente a una molécula de PEG y tiene una región variable de la cadena ligera de la SEC ID N° 1, y una región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2. Preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que está unida covalentemente a la cisteína en la posición 56 de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2. También preferentemente, en tal molécula el peso molecular del PEG es aproximadamente 0,5 kD a aproximadamente 30 kD, más preferentemente 20 kD.

En otra realización la divulgación proporciona una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo con una región variable de la cadena ligera de la SEC ID N° 1 y una región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2, en la que el dicho fragmento de anticuerpo se une covalentemente a una molécula PEG de 20 kD en la posición 56 de la región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2. Preferentemente, en tal molécula la molécula de PEG está unida covalentemente por medio de un enlace maleimida.

En otra realización la divulgación proporciona una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente al péptido Aβ humano entre las posiciones 13-28 de aminoácidos, en la que el fragmento de anticuerpo se une covalentemente a una molécula de PEG y tiene una región variable de cadena ligera de SEC ID

Nº 1, y una región variable de la cadena pesada de las SEC ID Nº 2. Preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que está unida covalentemente a la región bisagra del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, el PEG está unido covalentemente a la región bisagra por medio de un enlace maleimida.

- 5 La divulgación también incluye una molécula que comprende fragmentos de anticuerpos, preferentemente fragmentos de anticuerpos humanizados en los que la molécula PEG está unida covalentemente al fragmento de anticuerpo dando como resultado una molécula terapéutica activa con características farmacocinéticas y farmacodinámicas que permiten un régimen de dosificación semanal, a la vez que se minimizan los efectos secundarios potenciales que se pueden crear por la formación de complejos en el plasma y conservando o mejorando la actividad, afinidad y selectividad del fragmento de anticuerpo por el A $\beta$ .
- 10 La divulgación también incluye procedimientos de tratamiento, prevención e inversión de las afecciones y enfermedades asociadas con el péptido A $\beta$ , incluyendo la enfermedad de Alzheimer tanto pre-clínica como clínica, el síndrome de Down, y la angiopatía amiloide cerebral pre-clínica y clínica (CAA). Estos procedimientos comprenden la administración de una cantidad eficaz a un sujeto de una molécula descrita y reivindicada en el presente documento.
- 15 La presente divulgación proporciona una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente al péptido A $\beta$  entre las posiciones 13-28 de aminoácidos, en la que el fragmento de anticuerpos se une covalentemente a una molécula de PEG. Los inventores han encontrado que uniendo covalentemente una molécula PEG a un fragmento de anticuerpo que se une al A $\beta$  no se afecta negativamente la actividad, afinidad o selectividad del fragmento de anticuerpo para A $\beta$ . Más sorprendentemente, los inventores encontraron que uniendo
- 20 covalentemente una molécula de PEG que tiene un peso molecular de hasta 20 kDa a una CDR de un fragmento de anticuerpo que se une al A $\beta$  tampoco se altera negativamente la actividad, afinidad y selectividad de un fragmento de anticuerpo por el A $\beta$ . Estos fragmentos de anticuerpo se pueden administrar por vía subcutánea y tienen un mejor perfil PK/PD para su uso terapéutico permitiendo un régimen de dosificación flexible. Además, estos fragmentos de anticuerpo pueden producirse en sistemas celulares bacterianos o de levaduras que eliminan varios problemas
- 25 asociados con la producción de anticuerpos de longitud completa en células de mamífero. Los fragmentos de anticuerpo pegilados de la presente invención ofrecen la oportunidad de prevenir y tratar, tanto profiláctica como terapéuticamente, afecciones en seres humanos que se asocian con el péptido A $\beta$ .

30 Un anticuerpo de longitud completa como existe naturalmente es una molécula de inmunoglobulina compuesta por cuatro cadenas peptídicas, dos cadenas pesadas (H) (de aproximadamente 50-70 kDa cuando tienen una longitud completa) y dos cadenas ligeras (L) (de aproximadamente 25 kDa cuando tienen una longitud completa) interconectadas por puentes disulfuro. La parte del extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos, responsable primariamente del reconocimiento del antígeno. La parte del extremo carboxilo de cada cadena define una región constante responsable primariamente de la función efectora.

35 Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda y se caracterizan por una región constante particular. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera en el extremo N ("LCVR" en el presente documento) y una región constante de la cadena ligera compuesta por un dominio, CL. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, y define el isotipo de anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente y varios de estos se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>,

40 IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante particular. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada en el extremo N ("HCVR" en el presente documento) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios (CH1, CH2 y CH3) para la IgG, IgD, e IgA; y 4 dominios (CH1, CH2, CH3, y CH4) para IgM e IgE.

45 Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco conservadas ("FR"). Cada HCVR y LCVR está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En el presente documento las 3 CDR de la cadena pesada se denominan "CDRH1, CDRH2, y CDRH3" y las 3 CDR de la cadena ligera se denominan "CDRL1, CDRL2 y CDRL3." Las CDR contienen la mayoría de los restos que forman

50 interacciones específicas con el antígeno. La numeración y posicionamiento de los restos de aminoácidos de CDR en las regiones HCVR y LCVR están de acuerdo con la convención de numeración bien conocida de Kabat.

55 La región variable de cada par de cadenas ligera-pesada forma un sitio de unión al antígeno. Como se utiliza en el presente documento, la "parte de unión al antígeno" o "región de unión al antígeno" o "dominio de unión al antígeno" o "sitio de unión al antígeno" se refiere de manera intercambiable a la parte de una molécula de anticuerpo que contiene los restos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y le da al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. Esta parte del anticuerpo incluye los restos de aminoácidos "marco conservados" necesarios para mantener la conformación apropiada de los restos de unión al antígeno. Preferentemente, las regiones marco conservadas de los anticuerpos de la invención son de origen humano o sustancialmente de origen humano (con al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de origen humano) y siguiendo la numeración de Kabat. De

60 manera alternativa, la región de unión al antígeno se puede derivar de una secuencia humana.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, A $\beta$ ). Ejemplos que se engloban en la expresión "fragmento de anticuerpo" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmento Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH, y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, y (v) un fragmento dAb (Ward, y col., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH. Además, aunque los dos dominios VL y VH del fragmento Fv, se codifican por genes separados, se pueden juntar, utilizando procedimientos recombinantes, por medio de un enlazador sintético que los capacita para que se fabriquen como una cadena proteica única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (lo que se conoce como Fv de cadena sencilla (scFv)); véase por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que estén englobados en la expresión "fragmento de anticuerpo". Otras formas de anticuerpo de cadena sencilla, tales como los diacuerpos también se engloban en la expresión "fragmento de anticuerpo". Los diacuerpos son proteínas de unión bivalentes biespecíficas en las que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios de esta manera a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., y col. (1994) Structure 2:1121-1123).

Además, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para formar una molécula tetramérica de scFv (Kipriyanov, S. M., y col. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador polihistidina en el extremo C para formar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M., y col. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Los fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener utilizando técnicas de ADN recombinante, como se conoce bien en la técnica. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden estar glucosiladas o no y estar aún dentro de los límites de la invención. Preferentemente, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que está compuesto parcial o totalmente por secuencias de aminoácidos derivados de una línea germinal humana de anticuerpos o una secuencia reordenada y que se produce alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene CDR no humanas. Las regiones marco conservadas de las regiones variables se pueden sustituir por las correspondientes regiones marco conservadas humanas. Las regiones marco conservadas humanas incluyen regiones marco conservadas genómicas, así como las que contienen una o más sustituciones de aminoácidos. En particular, tales sustituciones incluyen mutaciones en las que se sustituye un aminoácido en una posición particular de la región marco conservada humana con el aminoácido de la posición correspondiente de la región marco conservada natural de la CDR no humana. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado que tiene CDR de ratón puede contener una o más sustituciones que remplacen un aminoácido de la región marco conservada humana con el aminoácido correspondiente de la región marco conservada de ratón. Más referencias que describen procedimientos que están implicados en la humanización de un anticuerpo de ratón y que se pueden utilizar son por ejemplo, Queen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869, 1991; Pat. de EE. UU. N° 5.693.761; Pat. de EE. UU. N° 4.816.397; Pat. de EE. UU. N° 5.225.539; los programas informáticos ABMOD y ENCAD que se describen por Levitt, M., J. Mol. Biol. 168:595-620, 1983; la humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321:522-525, 1986; Riechmann y col., Nature, 332:323-327, 1988; Verhoeyen y col., Science, 239:1534-1536, 1988). Preferentemente, un anticuerpo de la divulgación es un fragmento de anticuerpo humanizado. Más preferentemente, un anticuerpo de la divulgación es un fragmento de anticuerpo Fab humanizado.

La presente divulgación también incluye fragmentos de anticuerpo que están unidos covalentemente a una o más moléculas de PEG. Se pretende que el término "polietilenglicol" y "PEG" se utilice de manera intercambiable y se refiere al polietilenglicol o un derivado del mismo como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N°s: 5.445.090; 5.900.461; 5.932.462; 6.436.386; 6.448.369; 6.437.025; 6.448.369; 6.495.659; 6.515.100 y 6.514.491). Preferentemente, el PEG se une covalentemente a uno o más restos de lisina o cisteína del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, el PEG se une covalentemente a uno o más restos de lisina o cisteína en la región variable de la cadena pesada. Incluso más preferentemente, el PEG se une covalentemente a uno o más restos de lisina o cisteína en la CDR del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, el PEG se une a un resto cisteína en la posición 56 de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de dicha SEC ID N° 2. De manera alternativa, las moléculas de PEG se pueden unir al fragmento de anticuerpo por medio de una molécula enlazadora o espaciadora a la región bisagra del fragmento de anticuerpo. La adición de moléculas enlazadoras o espaciadoras a las regiones bisagra se conocen bien en la técnica. Además, un PEG se puede unir covalentemente a aminoácidos no naturales del fragmento de anticuerpo por técnicas que se conocen bien en la técnica.

En su forma típica, el "PEG" es un polímero lineal con grupos hidroxilo terminales y tiene la fórmula  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ , en la que  $n$  es desde aproximadamente 8 a aproximadamente 4000. El hidrógeno terminal se puede sustituir con un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcohol (M-PEG). Preferentemente, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferentemente es un grupo hidroxilo terminal. Es este grupo hidroxilo terminal el que se activa preferentemente para reaccionar con el péptido. Se utiliza una variedad de modificaciones químicas para preparar un derivado PEG activo con un grupo funcional, tal como un carbonato activo, éster activo, aldehído, tresilato, o utilizando PEG-propionaldehído adecuado para acoplarse a una determinada molécula diana. El derivado PEG activado se une entonces covalentemente a un grupo reactivo en el fármaco polipéptido. Hay varias formas de PEG útiles para la presente invención. Existen numerosos derivados de PEG en la técnica y son adecuados para su uso en la invención. No se pretende que la molécula de PEG unida covalentemente a un fragmento de anticuerpo de la presente invención esté limitada a un tipo o tamaño en particular. El peso molecular del PEG es preferentemente desde aproximadamente 0,5 kilodaltons (kD) a aproximadamente 100 kD y más preferentemente desde aproximadamente 5 kD a aproximadamente 30 kD y más preferentemente desde aproximadamente 1 kD a aproximadamente 20 kD. El PEG puede ser lineal o ramificado y el fragmento de anticuerpo anti-péptido A $\beta$  de la invención puede tener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 molécula de PEG unidas al péptido. Lo más preferible es que haya una molécula de PEG; sin embargo, cuando hay más de una molécula de PEG presente, se prefiere que no haya más de seis. Se contempla además que ambos extremos de la molécula de PEG se adapten para su entrecruzamiento con dos o más moléculas de fragmento de anticuerpo anti-péptido A $\beta$  juntas. Los procedimientos de unión de las moléculas de PEG a las proteínas, anticuerpos y fragmentos de los mismos, se conocen bien en la técnica.

El término " $K_D$ " como se utiliza en el presente documento pretende referirse a la constante de disociación de la interacción particular de un anticuerpo-antígeno. Se calcula por la fórmula:

$$KD = k_{\text{off}}/k_{\text{on}} \text{ (medido en M)}$$

El término " $k_{\text{on}}$ ", como se utiliza en el presente documento, está concebido para referirse a la tasa constante de asociación, o tasa de reacción específica, de la reacción directa o de formación de complejos, que se mide en unidades:  $\text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ . El término " $k_{\text{off}}$ ", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la tasa constante de disociación, o tasa específica de reacción, para la disociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno, medido en unidades:  $\text{seg}^{-1}$ .

La expresión "que se une específicamente" como se utiliza en el presente documento se refiere a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no se une significativamente a moléculas distintas de su(s) pareja(s) específica de unión. El término también se aplica cuando, por ejemplo, un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención es específico para un epítipo particular que lo tienen varios antígenos, en cuyo caso el anticuerpo específico que tiene el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a los varios antígenos que tengan el epítipo. En consecuencia, una molécula de la invención se une específicamente al péptido A $\beta$  aunque no se una específicamente a la APP. Además, una molécula de la invención se une específicamente a un epítipo A $\beta$  lineal, no lineal o conformacional que comprende los aminoácidos HHQKLVFFAEDVGSNK (13-28) (SEC ID N° 4).

El término "actividad" en referencia a una molécula de la presente invención incluye pero no está limitado por, la afinidad y especificidad epítipo/antígeno, la capacidad para neutralizar o antagonizar la actividad del péptido A $\beta$  *in vivo* o *in vitro*,  $\text{CI}_{50}$ , estabilidad *in vivo* del anticuerpo y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades biológicas identificables o características de un anticuerpo reconocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, la reactividad cruzada, (es decir, con homólogos no humanos del péptido diana, o con otras proteínas o tejidos, en general), y la capacidad para conservar niveles de expresión altos de proteína en células de mamífero. Las propiedades o características mencionadas anteriormente pueden observarse, medirse o evaluarse utilizando técnicas reconocidas en la técnica que incluyen pero no se limitan a ELISA, ELISA competitivo, Biacore o análisis de resonancia por plasmones superficiales KinExA, ensayos de neutralización *in vitro* o *in vivo* sin límite, unión al receptor, producción y/o secreción de citoquinas o factores de crecimiento, transducción de la señal e inmunohistoquímica con secciones tisulares de diferentes fuentes incluyendo seres humanos, primates, o cualquier otra fuente.

Los términos "individuo", "sujeto", y "paciente" que se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a un mamífero, preferentemente un ser humano. En una cierta realización, el sujeto se caracteriza además con una enfermedad o trastorno o afección que se beneficiaría de la disminución de la actividad del péptido A $\beta$ .

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo celular huésped" se utilizan de manera intercambiable e incluyen una célula individual o cultivo celular que es receptora de cualquier polinucleótido de la invención o cualquier vector recombinante que comprende una secuencia que codifica una CHVR, LCVR o anticuerpo monoclonal de la invención. Las células huésped incluyen la descendencia de una única célula huésped. La descendencia puede no ser completamente idéntica, en morfología o en un ADN total complementario, que la célula parental original debido a cambios y/o mutaciones naturales, accidentales, o deliberadas. Una célula huésped incluye células transformadas, transducidas o infectadas con un vector recombinante o un polinucleótido que expresa un fragmento de anticuerpo de la invención o una cadena

ligera o pesada del mismo. Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la invención, sea incorporado establemente en el cromosoma del huésped o no, también se denomina "célula huésped recombinante". Las células preferidas para generar células huésped de la invención son células CHO (por ejemplo, ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0, células COS (ATCC, por ejemplo, CRL-1650, CRL-1651) y HeLa (ATCC CCL-2).  
 5 Células huésped adicionales para su uso en la invención incluyen células vegetales, células de levadura, otras células de mamífero y células procariotas. Más preferentemente, las células para su uso en la invención son las células de levaduras o procariotas.

La expresión "afección o enfermedad relacionada con el péptido A $\beta$ " o "afecciones o enfermedades asociadas con la actividad del A $\beta$ " significa que incluye todas las afecciones, trastornos o enfermedades que se asocian con; 1) el desarrollo de placas de  $\beta$ -amiloides en el cerebro, 2) la síntesis de formas anormales de A $\beta$ , 3) la formación de formas particularmente tóxicas de A $\beta$ , o 4) las tasas anormales de síntesis, degradación, o aclaramiento de A $\beta$ . Se sabe o se sospecha que afecciones y enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebral, ciertas demencias vasculares, y discapacidad cognitiva leve, tienen tal relación con el A $\beta$ .

La presente divulgación proporciona una molécula que comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente al péptido A $\beta$  entre las posiciones de aminoácido 13- 28, en la que el fragmento de anticuerpo se une covalentemente a una molécula de PEG. El fragmento de anticuerpo es preferentemente un fragmento de anticuerpo humanizado, tal como un fragmento Fab o scFv. Más preferentemente el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab. La unión específica de las moléculas de la invención al péptido A $\beta$  permite que dichas moléculas se utilicen como un agente terapéutico para enfermedades o trastornos asociados con el péptido A $\beta$ , es decir, afecciones, enfermedades o trastornos que se benefician de la inhibición de la actividad biológica de un péptido A $\beta$ .

En una realización, el fragmento de anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena ligera comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: CDRL1: **SSSQSLIYSDGNAYLH** (SEC ID N° 6), CDRL2 : **KVSNRFS** (SEC ID N° 7) y CDRL3: **TQSTHSPWT** (SEC ID N° 8) y/o en el que la región variable de la cadena pesada comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos CDRH1: **GYTFSRYSMS** (SEC ID N° 9), CDRH2: **QINIRGCNTYYPDVTVKG** (SEC ID N° 10) o **QINIRGNNTYYPDVTVKG** (SEC ID N° 11), y CDRH3: **GDF** (SEC ID N° 12). Preferentemente, las seis CDR están juntas. La composición que comprende una CDR será en general una secuencia de cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo o una parte sustancial de la misma, en la que la CDR se sitúa en una localización consistente con la numeración de Kabat. Las tres regiones CDR de cada cadena, pesada y ligera, se proporcionan en una región marco conservada como una secuencia contigua representada por la siguiente fórmula: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Las FR1, FR2, FR3 y FR4 de la cadena pesada o la cadena ligera se combinan para formar la región marco conservada completa de un fragmento de anticuerpo cuando se ordenan en una secuencia contigua a las CDR en el orden establecido. Preferentemente, las regiones marco conservadas de un anticuerpo son de origen humano o sustancialmente de origen humano (es decir, mayor de aproximadamente el 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97%).

Preferentemente, el fragmento de anticuerpo de la divulgación comprende una LCVR que comprende un péptido con la siguiente secuencia:

40 **DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCSQQSLIYSDGNAYLHWYLQKP**  
**GQSPQLLIYKVSNRFSQVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG**  
**YYYCTQSTHSPWTFGGGKTKVEIK** (SEC ID N° 1)

Y una HCVR que comprende un péptido con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las siguientes secuencias;

45 **EVQLVESGGGLVKPGGSLRSLCAASGYTFSRYSMSWVVRQAPG**  
**KGLEWVGGQINIRGCNTYYPDVTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS**  
**LKTEDTAVYYCTTGDFWGGQGLVTVSS** (SEC ID N° 2)

**EVQLVESGGGLVKPGGSLRSLCAASGYTFSRYSMSWVVRQAPG**  
**KGLEWVGGQINIRGNNTYYPDVTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS**  
**LKTEDTAVYYCTTGDFWGGQGLVTVSS** (SEC ID N° 3)

50 De manera alternativa, el fragmento de anticuerpo comprende una LCVR que comprende un péptido con una secuencia que consiste en la SEC ID N° 1 y una HCVR que comprende un péptido con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 3, en el que la HCVR y la LCVR están juntas en un fragmento de anticuerpo. Los expertos en la técnica apreciarán que los fragmentos de anticuerpo no están limitados por secuencias específicas de HCVR y LCVR, sino que incluyen también variantes de estas secuencias, que cuando están presentes en una molécula de la invención, mantienen o mejoran su capacidad de unión al antígeno y al menos otra propiedad funcional del anticuerpo parental, por ejemplo, especificidad de epítipo, capacidad para competir con el anticuerpo parental por la unión al péptido A $\beta$ , o los valores de  $Cl_{50}$  y/o  $K_D$  o  $K_{off}$  para la unión a un péptido A $\beta$ .

En otra realización, toda o una parte de la región variable se limita a una secuencia LCVR particular como se muestra en la SEC ID N° 1 y HCVR que se muestra en la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 3 y se caracteriza además porque antagoniza o neutraliza al menos una actividad del péptido A $\beta$  *in vivo* o *in vitro*. Un anticuerpo, en el que toda o parte de la región variable está limitada por una secuencia particular como se muestra en un LCVR SEC ID N° 1 y HCVR SEC ID N° 2 o SEC ID N° 3 del presente documento se caracterizan además por unirse específicamente al péptido A $\beta$  humano pero no unirse a la APP humana.

En un aspecto, el PEG (o un derivado del mismo) se une covalentemente a uno o más restos de lisina, cisteína o de aminoácidos no naturales modificados de un fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la molécula de PEG se une covalentemente a cualquier región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que está unida covalentemente a una CDR de una región variable de cadena pesada del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, tal molécula tiene una molécula de PEG que se une covalentemente a la cisteína en la posición 56 de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2. De manera alternativa, las moléculas de PEG se pueden unir al fragmento de anticuerpo Fab anti-péptido A $\beta$  por medio de una molécula enlazadora o espaciadora en la región bisagra del fragmento de anticuerpo.

En otro aspecto, una molécula de PEG está unida covalentemente a uno más restos de lisina, cisteína o aminoácidos no naturales modificados del anticuerpo de la presente invención para reemplazar una glucosilación presente en las moléculas de anticuerpo sin afectar significativamente la afinidad y selectividad del fragmento de anticuerpo para el A $\beta$ . Preferentemente, la molécula de PEG reemplaza la señal de glucosilación en la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, la molécula reemplaza la señal de glucosilación en la CDR de una región variable de la cadena pesada del fragmento de anticuerpo. Más preferentemente, la molécula de PEG reemplaza la señal de glucosilación en la posición 56 de la región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2.

No se pretende que la molécula PEG unida covalentemente a un anticuerpo se limite a un tipo o tamaño particular. El peso molecular de PEG es preferentemente desde aproximadamente 0,5 kD a aproximadamente 100 kD, y más preferentemente desde aproximadamente 0,5 kD a aproximadamente 30 kD, y más preferentemente desde aproximadamente 1 kD a aproximadamente 20 kD. De manera alternativa, el peso molecular del PEG puede seleccionarse de entre un grupo que consiste en aproximadamente 0,5 kD, aproximadamente 1 kD, aproximadamente 5 kD, aproximadamente 10 kD, y aproximadamente 20 kD. El PEG puede ser lineal o ramificado y el anticuerpo anti-péptido A $\beta$  PEGilado puede tener más de una molécula de PEG unida al péptido. Preferentemente, hay una molécula de PEG por anticuerpo anti-péptido A $\beta$  PEGilado.

Más preferentemente, la molécula de anticuerpo comprende un fragmento de anticuerpo con una región variable de la cadena ligera de la SEC ID N° 1 y una región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2, en la que dicho fragmento de anticuerpo está unido covalentemente a una molécula de PEG de 20 kD en la posición 56 de la región variable de la cadena pesada de la SEC ID N° 2.

El epítipo antigénico del péptido A $\beta$  al que se unen los anticuerpos de la invención es un epítipo lineal, no lineal o conformacional que comprende los aminoácidos HHQKLVFFAEDVGSNK (SEC ID N° 4). Los anticuerpos que se unen a dicho epítipo, se unen específica y preferentemente al péptido A $\beta$  en comparación con su unión a la APP. Los anticuerpos monoclonales de la invención se unen al péptido A $\beta$  al menos 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces mayor (por ejemplo, una afinidad mayor o una mayor especificidad) que con la que se une a la APP humana; más preferentemente al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 veces mayor que con la que se une a la APP, e incluso más preferentemente no se une a la APP a niveles mayores que los niveles de fondo como se determina, por ejemplo, por un ensayo ELISA, ensayo ELISA de competición, o valores de  $K_D$  en un ensayo Biacore o KinExA.

Los fragmentos de anticuerpo se unen a un epítipo entre los aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEC ID N° 5) al menos 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces mayor (por ejemplo, mayor afinidad o mayor especificidad) que a un epítipo que no comprenda los aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEC ID N° 5). Más preferentemente, al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 veces mayor que a un epítipo que no comprenda los aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEC ID N° 5), incluso más preferentemente que no se una al epítipo que no comprenda los aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEC ID N° 5) a niveles mayores que los niveles de fondo que se determinan por ejemplo, por ensayo ELISA, ensayo ELISA de competición, o valores de  $K_D$  en un ensayo Biacore o KinExA.

En una realización preferida, la divulgación proporciona un fragmento de anticuerpo que posee una fuerte afinidad de unión por el péptido A $\beta$ , es decir, se une al péptido A $\beta$  o una parte del mismo que comprende la secuencia HQKLVFFAEDVGSNK (SEC ID N° 5) [es decir, el anticuerpo se pone en contacto con el polipéptido HQKLVFFAEDVGSNK], con una afinidad de unión ( $K_D$ ) para el péptido A $\beta$  humano de menos de aproximadamente 200 pM, 100pM, 50 pM, 40 pM o 30 pM, preferentemente menos de aproximadamente 20 pM según se mide con el procedimiento KinExA. De manera alternativa, la afinidad de unión ( $K_D$ ) para el péptido A $\beta$  está entre 0,1 pM – 200 pM. Las afinidades de anticuerpo se pueden determinar como se describe posteriormente en los ejemplos en el



presente documento u otros procedimientos disponibles en la técnica.

La vía de administración de un anticuerpo de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación, o tópica. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para su administración parenteral. El término parenteral como se utiliza en el presente documento incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal, o intraperitoneal. Se prefiere el suministro sistémico periférico por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Más preferentemente, la vía de administración de un anticuerpo de la presente invención es la inyección subcutánea. Los vehículos adecuados para tales inyecciones están claros en la técnica.

El fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene una semivida más corta que el anticuerpo anti-péptido A $\beta$  de longitud completa en el plasma y se aclara más rápidamente del plasma que el anticuerpo anti-péptido A $\beta$  de longitud completa. De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención tiene una semivida en el plasma más larga que el fragmento Fab que no se une covalentemente a una molécula de PEG, y se aclara menos rápidamente del plasma que el fragmento Fab anti-péptido A $\beta$  correspondiente, que no está unido a una molécula de PEG (Ejemplos 1, 2 y 3). El término "correspondiente" en referencia a un anticuerpo como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo con las mismas LCVR y HCVR. Por ejemplo, el anticuerpo de longitud completa correspondiente en referencia a un fragmento Fab de anticuerpo que tiene una LCVR de la SEC ID N $^{\circ}$  1 y una HCVR que consiste en la SEC ID N $^{\circ}$  2 debería tener la misma LCVR de la SEC ID N $^{\circ}$  1 y una HCVR que consiste en la SEC ID N $^{\circ}$  2 junto con un dominio Fc intacto.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a polinucleótidos recombinantes que codifican anticuerpos que cuando se expresan, comprenden la LCVR de la SEC ID N $^{\circ}$  1 y una HCVR que consiste en la SEC ID N $^{\circ}$  2. Debido a degeneraciones del codón, se pueden sustituir fácilmente esas secuencias de polinucleótidos por otras secuencias. Los polinucleótidos particularmente preferidos codifican anticuerpos, que cuando se expresan, comprenden las CDR de cadena ligera de las SEC ID N $^{\circ}$ s 6-8, y CDR de cadena pesada de la SEC ID N $^{\circ}$  9, 10 u 11, y 12, o cualquiera de las regiones variables de las SEC ID N $^{\circ}$  1 – SEC ID N $^{\circ}$  2. Ejemplos de polinucleótidos que codifican la LCVR de la SEC ID N $^{\circ}$  1 y la HCVR de la SEC ID N $^{\circ}$  2 se representan en la SEC ID N $^{\circ}$  13 (LCVR) y la SEC ID N $^{\circ}$  14 (HCVR), respectivamente.

Los polinucleótidos además incluirán típicamente una secuencia de polinucleótidos de control de la expresión unida operativamente a las secuencias que codifican la inmunoglobulina humanizada, incluyendo regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células eucariotas, pero también se pueden utilizar secuencias de control para células procariontas. Una vez que el vector se ha incorporado en la línea celular huésped apropiada, la célula huésped se propaga bajo condiciones adecuadas para la expresión de las secuencias de nucleótidos, y, si se desea, se puede continuar con la recolección y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadenas ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina.

Las secuencias de ácido nucleico capaces de expresar en último término los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo deseados se pueden formar a partir de una variedad de polinucleótidos diferentes (genómicos o ADNc, ARN, oligonucleótidos sintéticos, etc.) y componentes (por ejemplo, regiones V, J, D y C), utilizando una cualquiera de la variedad de técnicas bien conocidas. La unión de secuencias genómicas y sintéticas apropiadas es un procedimiento común de producción, pero se pueden utilizar también secuencias de ADNc.

Las secuencias de ADN de la región constante se pueden aislar de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferentemente de células B inmortalizadas. La fuente de células adecuada para las secuencias de polinucleótidos y células huésped para la expresión y secreción de inmunoglobulinas se pueden obtener de varias fuentes bien conocidas en la técnica.

Además de los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo que se describen específicamente en el presente documento, se pueden concebir y fabricar fácilmente otros anticuerpos modificados "sustancialmente homólogos" utilizando varias técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las regiones marco conservadas pueden variar de las secuencias nativas a nivel de la estructura primaria por sustituciones de varios aminoácidos, adiciones y eliminaciones terminales o intermedias, y similares. Además, se pueden utilizar una variedad de diferentes regiones marco conservadas humanas individualmente o en combinación como base para los anticuerpos humanizados de la presente invención. En general, las modificaciones de los genes se pueden conseguir fácilmente por una variedad de técnicas bien conocidas, tales como la mutagénesis dirigida al sitio.

Como se ha establecido anteriormente, los polinucleótidos se expresarán en los huéspedes después de que las secuencias se hayan unido operativamente (es decir, posicionado para asegurar el funcionamiento de) a una secuencia de control de expresión. Estos vectores de expresión típicamente se replican en las células huésped como episomas o como una parte integrante del ADN cromosómico del huésped. Habitualmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de las células huésped transformadas con las secuencias de ADN deseadas. Los vectores de expresión para estas

células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador, y sitios de información del proceso necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulinas, SV40, Adenovirus, Virus del Papiloma Bovino, citomegalovirus y similares.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias codificantes de cadena pesada y ligera y las secuencias de control de la expresión) se pueden transferir a la célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de célula. Se puede emplear una variedad de huéspedes para expresar los anticuerpos utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Las líneas celulares preferidas incluyen COS, CHO, SP2/0, NS0 (disponibles en depósitos públicos tales como la ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) y líneas celulares de levadura. Preferentemente, una célula huésped comprende uno o más vectores o construcciones que comprenden una molécula de ácido nucleico. La célula huésped es una célula en la que se ha introducido el vector, dicho vector comprende un polinucleótido que codifica una LCVR y/o un polinucleótido que codifica una HCVR. La divulgación también proporciona una célula huésped en la que se han introducido dos vectores; uno que comprende un polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo y uno que comprende un polinucleótido que codifica una HCVR presentes en un anticuerpo y cada una unida operativamente a una secuencia promotora. Los tipos celulares incluyen células de mamífero, bacterianas, vegetales y de levadura. Preferentemente, la célula es una célula CHO, una célula COS, una célula SP2/0, una célula NS0, una célula de levadura o un derivado o descendencia de cualquier tipo celular preferido.

Una vez que se han expresado, los anticuerpos intactos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina se pueden purificar de acuerdo con procedimientos de referencia de la técnica, que incluyen precipitación en sulfato amónico, intercambio iónico, cromatografía de afinidad, de fase inversa en columna de interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares. Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad al menos de aproximadamente el 90%, 92%, 94% o 96%, y se prefieren más con una homogeneidad del 98 al 99% o más, para usos farmacéuticos. Una vez que se purifican parcialmente o con la homogeneidad deseada, los péptidos se pueden entonces utilizar terapéutica o profilácticamente, como se determina en el presente documento.

Varios síntomas que dan como resultado déficit cognitivo, ictus, hemorragia cerebral, y debilitación mental general parece que están asociados con placas neuríticas y cerebrovasculares en el cerebro que contienen péptidos A $\beta$ . Entre estas afecciones están ambas enfermedades de Alzheimer clínica y pre-clínica, síndrome de Down, y angiopatía amiloide cerebral (CAA) clínica y preclínica. Las placas de amiloide están formadas por el péptido A $\beta$ . Estos péptidos circulan en la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR), típicamente en forma de complejos con lipoproteínas. El péptido A $\beta$  en forma circulante está compuesto por 38-43 aminoácidos (mayoritariamente 40 o 42 aminoácidos) como resultado de la escisión de una proteína precursora común, la proteína precursora de amiloide, a menudo denominada APP. Algunas formas de AP solubles son neurotóxicas por sí mismas y pueden determinar la gravedad de la neurodegeneración y el declive cognitivo (McLean, C. A., y col., Ann. Neurol. (1999) 46:860-866; Lambert, M. P., y col. (1998) 95:6448-6453; Naslund, J., J. Am. Med. Assoc. (2000) 283:1571).

Por lo tanto, una composición farmacéutica que comprenda una molécula de la invención puede ser útil para el tratamiento o prevención de afecciones en las que la presencia del péptido A $\beta$  produce o contribuye a efectos patológicos indeseables o en las que la disminución de la actividad del péptido A $\beta$  tiene un beneficio terapéutico en mamíferos, preferentemente en seres humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Alzheimer clínica o pre-clínica, síndrome de Down, angiopatía amiloide (CAA) clínica o pre-clínica y pródromos de Alzheimer. El uso de una molécula de la presente invención para tratar o prevenir al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente en los que la actividad del péptido A $\beta$  es perjudicial o que se benefician de la disminución de niveles de péptido A $\beta$  bioactivo están contemplados en el presente documento. Adicionalmente, se contempla el uso de una molécula de la presente invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a la obtención del efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser una cura completa o parcial de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la progresión de la enfermedad. "Tratamiento" como se utiliza en el presente documento, incluye la administración de un compuesto, particularmente a un ser humano, e incluye: (a) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (b) aliviar la enfermedad, es decir, producir la regresión de la enfermedad o trastorno o aliviar los síntomas o complicaciones de los mismos. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar una única embolada, varias dosis divididas durante un tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica.

Se puede incorporar una molécula de la invención en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Las moléculas de la invención se puede administrar solas o en combinación con un vehículo, diluyente, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, en dosis únicas o múltiples. Las composiciones

farmacéuticas para administración se conciben para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se utiliza un diluyente, vehículo y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes, y similares según sea apropiado (véase, por ejemplo, el Ejemplo 14 en el presente documento). Dichas composiciones se diseñan de acuerdo con técnicas convencionales como en, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona un compendio de técnicas de formulación que son conocidas en general por los facultativos.

Una composición farmacéutica que comprende una molécula de la presente invención se puede administrar a un sujeto en riesgo de mostrar patologías como las descritas en el presente documento utilizando técnicas de administración de referencia que incluyen la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o en supositorio. Preferentemente, una molécula de la presente invención se puede administrar a un sujeto en riesgo o que muestra las patologías que se han descrito en el presente documento por administración subcutánea.

Una composición farmacéutica de la invención es preferentemente una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de una molécula de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y tiempos necesarios para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la molécula para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial, se ha superado por los efectos beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como una dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes de o en un estadio temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz es al menos la dosis mínima, pero menor que una dosis tóxica, de un agente activo que es necesaria para producir un beneficio terapéutico en un sujeto. Establecido de otra manera, una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de la invención es una cantidad que en mamíferos, preferentemente seres humanos, disminuye la actividad del péptido A $\beta$ , por ejemplo uniéndose al péptido A $\beta$ , cuando la presencia del péptido A $\beta$  produce o contribuye a efectos patológicos indeseables o la disminución del péptido A $\beta$  da como resultado un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, preferentemente un ser humano.

La vía de administración de una molécula de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación, o tópica. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. El término parenteral como se utiliza en el presente documento incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal, o intraperitoneal. Se prefiere el suministro sistémico periférico por inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. La inyección subcutánea es la más preferida. Los vehículos adecuados para tales inyecciones están claros en la técnica.

La composición farmacéutica típicamente debe estar estéril y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento en el envase proporcionado, que incluye por ejemplo, un vial sellado o una jeringa. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse por filtración tras la fabricación de la composición, o hacerse de otra manera microbiológicamente aceptable. Una composición típica para la infusión intravenosa podría tener un volumen igual a 250-1000 ml de fluido, tal como una solución de Ringer estéril, solución salina fisiológica, solución de dextrosa y solución de Hank y una dosis terapéuticamente eficaz, (por ejemplo, 1 a 1000 mg/ml, o más) del agente terapéutico para suministrar las dosis típicas enumeradas posteriormente. La dosis puede variar dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad. Como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para cada uno de los sujetos depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administren concurrentemente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000  $\mu$ g; sin embargo se contemplan dosis por encima y por debajo de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. El régimen de dosificación parenteral diario puede ser de aproximadamente 0,1  $\mu$ g/kg a aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 0,3  $\mu$ g/kg a aproximadamente 10 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 1  $\mu$ g/kg a 1 mg/kg, incluso más preferentemente desde aproximadamente 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal por día. El progreso se debe controlar por evaluación periódica. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, por lo que no están excluidos. La dosificación deseada puede suministrarse en una administración única en embolada, por administraciones de múltiples emboladas, o por administración en infusión continua de la molécula, dependiendo del patrón de declive farmacocinético que el facultativo quiera conseguir.

Estas cantidades que se sugieren de las moléculas de la invención están sometidas a una gran dispersión de criterios terapéuticos. El factor clave en la selección y programación de una dosis apropiada es el resultado obtenido. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno en particular que se va a tratar, el

mamífero en particular que se va a tratar, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del anticuerpo, el tipo particular de anticuerpo, el procedimiento de administración, la programación de administración, y otros factores conocidos por los facultativos médicos.

5 Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo estéril adecuado antes de su utilización. La liofilización y reconstitución puede dar lugar a varios grados de pérdida de actividad del anticuerpo. Las dosificaciones pueden tener que ajustarse para compensar.

10 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención. Los ejemplos siguientes en el presente documento emplean, entre otros, un anticuerpo monoclonal murino llamado "266" (m266) que se preparó originalmente por inmunización con un péptido compuesto por los restos 13-28 del péptido A $\beta$  y un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal murino llamado 266 (m266-Fab). Se ha confirmado que el anticuerpo inmunorreacciona con este péptido. La preparación del m266 se había descrito anteriormente. Para unir covalentemente una molécula de PEG al m266-Fab, se puede mutar el Fab para introducir un resto de cisteína en la CDR2 (N56C) de la cadena pesada variable y se PEGila de la manera que se muestra posteriormente (Ejemplo 4). Como los ejemplos descritos aquí describen experimentos realizados en sistemas murinos, el uso de anticuerpos monoclonales murinos es satisfactorio. Sin embargo, en los procedimientos de tratamiento de la invención previstos para su uso en seres humanos, se prefieren las formas humanizadas de los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de los mismos. El 1A1-Fab al que se refieren los ejemplos posteriores es un fragmento Fab de anticuerpo que comprende la LCVR de la SEC ID N<sup>o</sup> 1 y la HCVR de la SEC ID N<sup>o</sup> 2.

### Ejemplo 1

#### 20 Estudios PK/PD del m266-Fab PEG subcutáneo en ratones PDAPP

Se utilizaron ratones transgénicos PDAPP jóvenes (de 3 meses de edad) con el fin de estudiar la respuesta farmacocinética/farmacodinámica en el plasma del anticuerpo y el complejo anticuerpo-A $\beta$ . Se investigaron varios anticuerpos que incluían el Fab 266 de ratón (m266-Fab), m266-Fab+PEG de 5 kD, m266-Fab+PEG de 10 kD, m266-Fab+PEG de 20 kD, y el anticuerpo IgG m266 de longitud completa intacto. Se inyectaron ratones PDAPP +/- por vía subcutánea con 1 mg/kg de anticuerpo y se aisló posteriormente el plasma en los siguientes puntos de tiempo: 1, 4, 8, 24, 48, 96, 168, y 240 horas post dosis. Los animales que recibieron el anticuerpo m266-Fab se analizaron en puntos de tiempo tempranos adicionales debido a la pérdida rápida de este resto. Los puntos de tiempo para el m266-Fab eran los siguientes: 1, 4, 8, 12, 16, 24, y 48 horas post dosis. Se analizaron un total de cinco animales por anticuerpo por punto de tiempo. Se obtuvo la sangre completa por medio de punción cardíaca con agujas de 23-gauge conectadas a jeringas de 1 cc que se habían aclarado previamente con EDTA 0,5 M. Las muestras de sangre se incubaron en hielo durante el procedimiento de aislamiento y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm en una microcentrífuga refrigerada a 4 grados durante 15 minutos. Las muestras de plasma resultantes se dispusieron en alícuotas y se almacenaron a -80 grados.

#### A. Metodología para el análisis de la PK de Fab

35 Las concentraciones de Fab en el plasma se determinaron utilizando un ELISA de captura del antígeno, las placas se revistieron con un conjugado A $\beta$ -BSA durante una noche a 4 °C o una hora a 37 °C bloqueándose después con un tampón de caseína Pierce. Se añadieron las referencias, muestras de control, y muestras de estudio en las placas y se continuó con una incubación de una hora a temperatura ambiente. Se utilizó un HRP anti-ratón de cabra para la detección y se desarrolló una respuesta colorimétrica con el sustrato OPD. Las placas se leyeron a una absorbancia de A493 con una referencia de A700. Las concentraciones de inmunoreactividad de las muestras de plasma se determinaron a partir de curvas de referencia que se prepararon con cantidades conocidas de m266-Fab en el plasma de ratones utilizando un algoritmo de 4/5 parámetros. El intervalo de ensayo del m266-Fab es de 0,05 a 0,5  $\mu$ g/ml. El intervalo de los Fab PEGilados es de 0,075 a 0,8  $\mu$ g/ml.

45 Las concentraciones de inmunoreactividad de las muestras de plasma se determinan a partir de curvas de referencia que se preparan con cantidades conocidas de m266-Fab en el plasma de ratón utilizando un algoritmo de 4/5 parámetros. El intervalo de ensayo del m266-Fab es de 0,05 a 0,5  $\mu$ g/ml. El intervalo de los Fab PEGilados es de 0,075 a 0,8  $\mu$ g/ml. Los resultados demuestran claramente que la adición de una molécula de PEG y el aumento del tamaño de la molécula de PEG aumentan la retención de los Fab Pegilados en el plasma (2.545 ng/ml tras 8 horas para el m266-Fab Pegilado de 20 K) en comparación con los m266-Fab no Pegilados (350 ng/ml tras 8 horas).

#### 50 B. Ensayo ELISA de m266 A $\beta$

Con el fin de medir la cantidad de A $\beta$  en el plasma en ausencia o en presencia del anticuerpo terapéutico (de longitud completa o fragmento Fab) se desarrolló y utilizó un ensayo ELISA. Los péptidos A $\beta$  que se van a medir en estos ensayos son el A $\beta$ 1-40 o el A $\beta$ 1-42 de longitud completa. Se revistieron los 96 pocillos de placas de ELISA Immulon 4HBX de 96 pocillos (Thermo Labsystems) durante una noche a 4 grados con anticuerpo de captura del extremo C (m2G3 para placas A $\beta$ 40 o m21F12 para placas A $\beta$ 42) a 10  $\mu$ g/ml en PBS (100  $\mu$ l por pocillo). Las placas de ensayo se sellaron para evitar la evaporación durante la incubación de una noche. Al día siguiente, se eliminó la solución de los pocillos y se lavaron los pocillos tres veces con PBS (400  $\mu$ L por pocillo) con un limpiador de placas

de 95 pocillos Labsystems. Se añadió un tampón de bloqueo (360 µl de PBS-leche al 1%) y se incubaron las placas a 37 grados durante una hora. Las muestras se prepararon diluyendo el plasma en los diluyentes de muestras para producir lo siguiente: un 20% de plasma, 0,5 M de guanidina, 5 mM de Tris pH 8,0, 0,5 x cóctel inhibidor de proteasa, 25 µg/ml de m266, y PBS. Puede ser necesaria la disminución del volumen de plasma que se utiliza en el ensayo en ciertos puntos de tiempo debido a los altos niveles de péptido Aβ presentes, y en estos casos, el volumen de plasma residual se ajustó con plasma de rata (el porcentaje de volumen final se mantuvo al 20%). Las referencias de Aβ en las concentraciones, que variaban de 250 pg/ml a 3,9 pg/ml, se generaron en el diluyente de referencia (20% de plasma de rata, 0,5 M de guanidina, 5 mM de Tris pH 8,0, y 0,5 x de cóctel inhibidor de proteasas Completo libre de EDTA (Roche Diagnostics), 25 µg/ml de m266, y PBS). Es necesaria la incorporación de 25 µg/ml de m266 intacto en ambos diluyentes, de referencia y de muestra, con el fin de neutralizar cualquier interferencia negativa que puedan ejercer los niveles variables del dominio central de los anticuerpos en el ensayo. Después del bloqueo, las placas se lavaron 4 veces con PBS. Las muestras y las referencias se cargaron por triplicado (100 µl por pocillo) y se selló y se incubó la placa una noche a 4 grados. A la mañana siguiente, se lavaron las placas 4 veces con PBS-T (PBS + 0,05% de Tween-20) y se incubaron los pocillos con el anticuerpo secundario biotinilado m3D6 (100 µl por pocillo diluido en 0,5% de BSA/PBS-T) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las placas 4 veces con PBS-T, se incubaron con estreptavidina-poliHRP (1:5000 en 0,5% de BSA/PBS-T) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-T y se añadieron 100 µl de sustrato TMB (Sigma) por pocillo. Se controló la progresión colorimétrica a 650 nm a los 15, 30 y 60 minutos.

Tabla 1. Resultados Farmacocinéticos: Concentración media del plasma para Aβ40 (pg/ml)

Tiempo (h)	m266 Fab	m266 Fab + 5KD PEG	m266 Fab + 10KD PEG	m266 Fab + 20KD PEG	m266 Intacto
1	246,7	253,5	178,4	196,3	223,7
4	498,8	693,2	898,1	816,6	1110
8	576,7	997,8	1011	1259	1852
12	530,9				
18	344,1				
24	181,2	914,7	1728	2966	6919
48		200,1	789,6	2642	8557
96		79,1	104,8	329,3	10792
168		62,64	76,49	143,3	9923
240		50,14	98,24	101,2	6114

Además de que se puede manipular una programación más flexible basándose en el tamaño del PEG, los resultados demuestran que el complejo Fab PEGilado-antígeno no se acumula en el plasma circulante durante grandes cantidades de tiempo como pasa con el anticuerpo intacto (m266 intacto). El anticuerpo intacto prolonga la semivida del anticuerpo en el plasma y da como resultado un complejo antígeno:anticuerpo que está presente en el plasma circulante durante grandes cantidades de tiempo (> 240 horas). Los Fab nativos (m266 Fab) por otra parte tienen una tasa de aclaramiento rápida y una semivida corta (< 24 horas) lo que los limita como terapia. Por el contrario, como se demuestra en la Tabla 1, los Fab Pegilados proporcionan una molécula de anticuerpo con características farmacocinéticas y farmacodinámicas que permiten un régimen de dosificación mejor.

## Ejemplo 2

### Estudios PK/PD del 1A1-Fab PEG subcutáneo en ratones PDAPP

Los estudios se llevaron a cabo en ratones transgénicos PDAPP jóvenes (de 3 meses de edad) con el fin de investigar la respuesta farmacocinética/farmacodinámica plasmática del anticuerpo y el complejo anticuerpo- Aβ. Se investigaron varios anticuerpos incluyendo 1A1-Fab humanizado, 1A1-Fab+ PEG de 5 kD, 1A1-Fab+ PEG de 10 kD, y 1A1-Fab+ PEG de 20 kD. Se inyectaron los ratones PDAPP+/- por vía subcutánea con 1 mg/kg de anticuerpo y se aisló posteriormente el plasma en puntos de tiempo diferentes dependiendo del grupo de inyección de anticuerpo. Se utilizaron los siguientes puntos de tiempo para los distintos anticuerpos:

- El 1A1-Fab se extrajo a las 1, 4, 8, 12, 18, 24, y 48 horas post dosis
- El 1A1-Fab+ PEG de 5 kD se extrajo a las 1, 4, 8, 24, 48, 96, y 168 horas post dosis
- El 1A1-Fab+ PEG de 10 kD se extrajo a las 1, 4, 8, 24, 48, 96, y 168 horas post dosis
- El 1A1-Fab+ PEG de 20 kD se extrajo a las 1, 8, 24, 48, 96, 168, y 240 horas post dosis

Se analizaron un total de cinco animales por anticuerpo por punto de tiempo. Las muestras de plasma resultantes se dispusieron en alícuotas y se almacenaron a -80 grados.

A. Metodología del análisis PK del Fab

Se determinaron las concentraciones de 1A1 Fab en el plasma utilizando un ELISA sándwich. Se revistieron las placas con referencias de IgG kappa anti-humana de cabra, se añadieron las muestras control, y muestras de estudio a las placas y luego se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Se utilizó una IgG antihumana de cabra para la detección de una respuesta colorimétrica tras la adición de OPD. Las placas se leyeron a una absorbancia de A493 con una referencia de A700.

Se determinaron las concentraciones de las muestras de plasma a partir de curvas de referencia preparadas con cantidades conocidas de 1A1 Fab en el plasma de ratón utilizando un algoritmo de 4/5 parámetros; el intervalo para el ensayo Fab y Fab-PEG de 5k es de 0,003 a 0,3 µg/ml; los intervalos para los ensayos del Fab- PEG de 10 k son de 0,006 a 0,2 y 0,04 a 0,4 µg/ml; los intervalos para los ensayos del Fab-PEG de 20 k son 0,02-0,4 y 0,04-0,4 µg/ml. Los resultados demuestran claramente que la adición de una molécula de PEG y el aumento del tamaño de la molécula de PEG aumenta la retención de los Fab pegilados en el plasma (77 ng/ml tras 96 horas para el 1A1 Fab Pegilado 20 K) en comparación con el 1A1 Fab no Pegilado (no detectable tras 24 horas).

B. Ensayo ELISA de 1A1 Aβ

El ELISA es esencialmente el mismo que se ha descrito anteriormente para el m266. Las muestras se preparan por dilución del plasma en diluyentes de la muestra para producir lo siguiente: un 20% de plasma, 0,5 de guanidina, 5 mM de Tris pH 8,0, 0,5 x de coctel inhibidor de proteasa, 20 µg/ml de 1A1, y PBS. En estos ensayos los péptidos Aβ que se medían eran Aβ1-40 o Aβ1-42. La progresión colorimétrica se controló a los 15, 30, y 60 minutos. Los resultados se presentan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Resultados farmacodinámicos: Concentración media en el plasma para Aβ 40 (pg/ml)

Tiempo (h)	1A1 Fab	1A1 Fab + 5KD PEG	1A1 Fab + 10KD PEG	1A1 Fab + 20KD PEG
1	136,8	117,1	116,3	111,2
4	153,6	208,2	281,6	
8	96,65	198,4	406,3	529,2
12	131,9			
18	105,9			
24	114,7	133,6	585,1	1243
48	106,8	95,12	170,7	642
96		88,48	113,7	177,9
168		93,96	110,8	125,4
240				200

De manera similar a los Fab m266 del Ejemplo 1, los datos de la Tabla 2 demuestran que los Fab humanizados que se unen covalentemente a una molécula de PEG proporcionan también un perfil PK/PD ideal para una programación de dosificación flexible mientras que se evita la acumulación del complejo anticuerpo-antígeno en el plasma circulante durante grandes cantidades de tiempo.

**Ejemplo 3**

**Purificación de análogos de 266 murinos y 1A1 Fab humanizados**

Se purificaron los sobrenadantes de los cultivos de células transfectadas con 266 Fab de ratón o 1A1 Fab humanizado utilizando una estrategia de cromatografía en dos etapas que consistía en cromatografía de intercambio iónico seguida por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando la resina Superdex 75 (GE Healthcare). Tras la recolección, se concentró el sobrenadante utilizando TFF y se dializó con un volumen en exceso de 20 veces de acetato sódico 10 mM pH 5 durante una noche a 4 °C. Se eliminó el precipitado por centrifugación y el sobrenadante se cargó sobre una cama empaquetada de sepharosa SP (GE Healthcare) cargada con acetato sódico 10 mM a pH 5. La columna se lavó con acetato sódico 10 mM a pH 5 que contenía sucesivamente mayores cantidades de NaCl hasta que se eluyó el fragmento Fab, aproximadamente de 90 a 110 mM de NaCl. Las fracciones de columna que contenían el Fab activo se identificaron y se agruparon. El volumen se redujo y se intercambió con un tampón (PBS) utilizando un dispositivo de concentración en centrifuga (Millipore). Se ajustó el volumen final a 13 ml y se cargó en una columna de tamaño Superdex 75. Se identificaron y agruparon las fracciones que contenían Fab de aproximadamente 50 kD para su posterior caracterización y PEGilación.

**Ejemplo 4****PEGilación y caracterización *in vitro***

Se bloqueó la cisteína N56C del 1A1-Fab purificado del cultivo celular por PEGilación. Se utilizaron perlas Pierce's Reduce-Imm™ Immobilized Reductant para reducir selectivamente la Cisteína N56C. Las perlas reductoras se extrajeron de la columna proporcionada por el fabricante y se utilizaron en modo discontinuo. Se activaron primero ~ 4 ml de perlas con 8 ml de DTT 10 mM en tampón de Equilibración Reduce-IMM n° 1 (fosfato sódico + EDTA, pH 8,0) durante 30 min. Las perlas se lavaron entonces 3 veces con PBS. Se añadieron a las perlas 18 ml de 1A1 N56C Fab a 1,7 mg/ml en PBS pH 7,4 y se añadieron 10 mM de EDTA a la mezcla. La mezcla se sometió a rotación y se incubó a temperatura ambiente durante 4-5 horas. Se separó el Fab de las perlas utilizando separadores de resina Handee™ y se lavaron las perlas con PBS. Se combinaron los Fab y los lavados, y se hicieron reaccionar con un exceso molar de 5 veces de PEG-maleimida (PEG 20 k de NOF; PEG 10 k de Sunbio; PEG 5 k de Nektar) durante 1 hora. La mezcla de reacción se dializó con 4 l de tampón de acetato sódico 10 mM pH 5,0. El Fab y el Fab-PEG que no reaccionaron se eluyeron en un gradiente de sal. Se eluyeron entre 50 mM y 70 mM de NaCl. Además se purificó la proteína por cromatografía por exclusión de tamaño (en columna Superdex75, GE Healthcare) con PBS como fase móvil. La reacción de reducción se puede escalar hacia arriba y abajo. Se pueden utilizar procedimientos similares para preparar 266Fab N56C PEGilado.

Las muestras se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño para confirmar la adición de PEG al Fab. La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo con la columna TSK G3000PW XL (Tosoh Bioscience). La columna se procesó a 0,5 ml/min con PBS más 0,35 M de NaCl a pH 7,4 utilizando una HPLC analítica serie HP1100 Agilent procesando a 214 nm. Además, se analizaron las muestras con SDS-PAGE. Se cargaron 10 µg de material purificado en un Gel Bis-Tris NuPage® al 4-12% y se tiñó con SimplyBlue™ SafeStain.

**Ejemplo 5****Medición de las constantes cinéticas con Biacore**

Se utilizó también el instrumento Biacore® 2000 para medir las cinéticas de unión. El Biacore® utiliza las propiedades ópticas de la resonancia de plasmones superficiales para detectar alteraciones en la concentración de proteínas de las moléculas que interactúan con una matriz dextrano del biosensor. Excepto cuando se señala, todos los reactivos y materiales se adquirieron en Biacore® AB (Upsala, Suecia). Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C. Se disolvieron las muestras en tampón HBS-EP (150 mM de cloruro sódico, 3 mM de EDTA, 0,005% (p/v) de tensioactivo P-20, y 10 mM de HEPES, pH 7,4). Se inmovilizó un anticuerpo kappa anti-humano de cabra en las celdas del flujo 1 a 4 de un chip sensor CM5 a un nivel de 8000 unidades de respuesta (Ru) utilizando un kit de acoplamiento amina.

Se evaluó la unión utilizando múltiples ciclos analíticos. Cada ciclo se lleva a cabo a una tasa de flujo de 50 µl/minuto y consiste en las siguientes etapas: inyección de ~ 20 µl de una composición de anticuerpo de unión a 10 µg/ml que pretende una captura de 400-500 Ru, inyección de 250 µl de Abeta humano (1-40) (comenzando a 200 nM y utilizando diluciones en serie de dos veces para cada ciclo) seguido por 20 minutos para la disociación, y degeneración utilizando ~ 30 µl de hidrócloruro de glicina 10 mM, pH 1,5. Las tasas de asociación y disociación para cada ciclo se evaluaron utilizando un modelo "1:1 unión (Langmuir)" en el software BIAevaluation. Los resultados muestran que la PEGilación en el sitio N56C tiene poco impacto en la afinidad de unión del Fab con el Abeta humano.

**Ejemplo 6****Medición de las constantes de equilibrio con KinExA**

Se utilizó el análisis KinExA como estrategia ortogonal para medir la afinidad de unión por medio del análisis de equilibrio de unión debido a la lenta velocidad de disociación del complejo antígeno Fab. Se utilizó un instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Inst. Inc.) para medir las cinéticas de unión. En resumen, el antígeno se une covalentemente a perlas de sepharosa y se detecta la unión de Fab libre/Fab-PEG a las perlas con el instrumento. Para medir la K<sub>d</sub>, se incubaron tubos individuales que contenían Fab/Fab-PEG (20 pM a 500 pM para 1A1-Fab- PE 20 k, 5 pM o 50 pM para 1A1-Fab) con antígeno Abeta humano soluble diluido disminuyendo en serie (1-40) (0-10 nM), durante 30-50 h a 37 °C en PBS que contenía 1 mg/ml de BSA para asegurar la consecución del equilibrio. Tras la incubación, se determinó el Fab libre/Fab-PEG en cada muestra equilibrada en el KinExA 3000 según las instrucciones del fabricante. Se determinaron los valores de K<sub>d</sub> por un análisis n-Curve utilizando el software KinExA 3000. Los resultados demuestran que el 1A1 Fab se une firmemente al Abeta humano (19 pM), con una afinidad ~ 10 veces más alta comparada con la del 266 Fab (240 pM). Además, la unión covalente de PEG de 20 K en el sitio N56C no tiene impacto sobre la afinidad del 1A1-Fab (12 pM).

**Ejemplo 7**

**Análisis de unión a la Proteína Precursora de Amiloide (APP) utilizando ELISA basado en células**

5 Para evaluar la reactividad cruzada de 266 Fab/mAb con la APP precursora de Abeta, se utilizaron células HEK 293 que expresaban establemente APP (aa 1-751). Estas células se crearon clonando el gen de APP (1-751) en un plásmido que contenía el marcador de resistencia a la neomicina. El plásmido recombinante se transfectó en HEK 293 y se seleccionaron las células en 200 µg/ml de G418 para generar una línea celular estable de sobre-expresión. Para los análisis de unión, se colocaron en placas 75.000 células APP 751 en cada pocillo de una placa revestida de 96 pocillos. Después de la incubación durante 2 días en medios de crecimiento (DMEM F12, 5% FBS, 10 mM de Hepes pH 7,5, 200 µg/ml de G418), se retiró el líquido y se añadieron 20 µg/ml de Fab o mAb en PBS (con Ca/Mg) que contenía 10 mg/ml de BSA. La unión se deja en proceso durante 2 horas a 4 °C y se lavan las células 3x con BSA a 10 mg/ml. Se añade un anticuerpo secundario (anti cadena ligera kappa conjugado con peroxidasa de rábano rústico (hrp)) específico para la cadena ligera humana o de ratón, en PBS/BSA (Southern Biotech). Se utilizó una dilución de 1:5000 en PBS/BSA para el anti-cadena ligera humana y 1:2000 para el anti-cadena ligera de ratón. Tras una hora de incubación a 4 °C, se lavaron las células 5x con BSA/PBS. Se midió la actividad de Hrp, como una función de la unión Fab/mAb a la APP, añadiendo el sustrato TMB durante 10 minutos. Las reacciones se transfirieron a una placa transparente de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 650 nm. Los datos indican que el 1A1-Fab (5 kD, 10 kD, y 20 kD) y el m266-Fab Pegilados confieren selectividad para el péptido Abeta sobre la APP.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Eli Lilly and Company Bales, Kelly R Bumol, Thomas F Chow, Chi-Kin Demattos, Ronald B Hansen, Ryan Kuchibholta, Uma Lu, Jirong McDonnell, Peter
- 25 <120> Fab Amiloide beta pegilado
- <130> X17087
- <150> US 60/885439
- 30 <151> 18-01-2007
- <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.4
- 35 <210> 1
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> artificial
- 40 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 1



ES 2 535 641 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Ser Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser  
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 2  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> construcción sintética

10

<400> 2

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

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

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

Gly Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60

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

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

Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

<210> 3  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> construcción sintética

10

<400> 3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr



ES 2 535 641 T3

<220>  
<223> construcción sintética

5 <400> 8

**Thr Gln Ser Thr His Ser Pro Trp Thr**  
**1 5**

10 <210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> construcción sintética  
<400> 9

**Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser**  
**1 5 10**

20 <210> 10  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> artificial

25 <220>  
<223> construcción sintética  
<400> 10

30 **Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys**  
**1 5 10 15**

35 <210> 11  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> artificial

40 <220>  
<223> construcción sintética  
<400> 11

**Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

45 <210> 12  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> artificial

50 <220>  
<223> construcción sintética  
<400> 12

**Gly Asp Phe**  
**1**

5 <210> 13  
<211> 657  
<212> ADN  
<213> artificial

10 <220>  
<223> construcción sintética

<400> 13

```

gacatcgtta tgactcagac tccattgtcc ttgtctgta ctccaggtca accagcttct      60
atctcctggt cctcctoccca atctttgatc tactccgacg gtaacgctta cttgcaactgg      120
tacttgcaaa agcctggtca atccccacaa ttgttgatct acaagggttc caacagattc      180
tctggtggtc ctgacagatt ttctggttcc ggttccggtg ctgacttcac tttgaagatc      240
tccagagttg aagctgagga tgttggtggt tactactgta ctcagtccac tcattcccca      300
tggaactttg gtggtggtac taagggtgag atcaagagaa ctggtgctgc tccatccggt      360
ttcattttcc caccatccga cgaacaattg aagtctggta ctgcttccgt tgtttgtttg      420
ttgaacaact tctaccaag agaggotaag gttcagtgga aggttgacaa cgctttgcaa      480
tccgtaact cccaagaatc cgttactgag caagactcta aggactccac ttactccttg      540
tcctccactt tgactttgtc caaggctgat tacgagaagc acaaggttta cgcttgtag      600
gttacacatc agggtttgtc ctcccagtt actaagtctt tcaacagagg agagtcc      657

```

15 <210> 14  
<211> 657  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> construcción sintética

<400> 14

ES 2 535 641 T3

<b>gaggttcagt</b>	<b>tggttgaatc</b>	<b>tggtggtgga</b>	<b>ttggttaagc</b>	<b>ctggtggttc</b>	<b>tttgagattg</b>	<b>60</b>
<b>tcctgtgctg</b>	<b>cttccggtta</b>	<b>cactttctcc</b>	<b>agatactcca</b>	<b>tgctctgggt</b>	<b>tagacaagct</b>	<b>120</b>
<b>ccaggaaag</b>	<b>gattggagtg</b>	<b>ggttggtaaa</b>	<b>atcaacatca</b>	<b>gaggttgtaa</b>	<b>cacttactac</b>	<b>180</b>
<b>ccagacactg</b>	<b>ttaagggaa</b>	<b>attcactatc</b>	<b>tccagagatg</b>	<b>actccaagaa</b>	<b>cactttgtac</b>	<b>240</b>
<b>ttgcagatga</b>	<b>actccttgaa</b>	<b>aactgaggac</b>	<b>actgctgttt</b>	<b>actactgtac</b>	<b>tactggtgac</b>	<b>300</b>
<b>tttggggac</b>	<b>agggaaactt</b>	<b>ggttactggt</b>	<b>tcctccgctt</b>	<b>ctactaagg</b>	<b>accatccggt</b>	<b>360</b>
<b>tttccattgg</b>	<b>ctccatcctc</b>	<b>taagtctact</b>	<b>tcgggtggt</b>	<b>ctgctgcttt</b>	<b>gggatgttg</b>	<b>420</b>
<b>gtaaggact</b>	<b>acttcccaga</b>	<b>gccagttact</b>	<b>gtttcttgg</b>	<b>actccggtgc</b>	<b>tttgacttct</b>	<b>480</b>
<b>ggtgttcaca</b>	<b>ctttcccagc</b>	<b>tgttttgcaa</b>	<b>tcttccggtt</b>	<b>tgtactcctt</b>	<b>gtcctccggt</b>	<b>540</b>
<b>gttactgttc</b>	<b>catcctcttc</b>	<b>cttgggtact</b>	<b>cagacttaca</b>	<b>tctgtaacgt</b>	<b>taaccacaag</b>	<b>600</b>
<b>ccatccaaca</b>	<b>ctaaggttga</b>	<b>caagaaggtt</b>	<b>gaaccaaagt</b>	<b>cctctgacaa</b>	<b>gactcac</b>	<b>657</b>

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula que comprende un fragmento Fab de anticuerpo que se une específicamente al péptido A $\beta$  humano entre las posiciones de aminoácidos 13 a 28, en la que el fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de la SEC ID N° 1 y una región variable de cadena pesada de la SEC ID N° 2, y en la que dicho fragmento de anticuerpo Fab se une covalentemente a una molécula de polietilenglicol de 20 kD en la cisteína del aminoácido 56 de la SEC ID N° 2.
2. Una molécula de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la molécula de polietilenglicol se une por medio de un enlace maleimida.
3. Una molécula de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso como un medicamento.
- 10 4. Una molécula de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento o prevención de una afección asociada con la actividad del péptido A $\beta$ , en el que la afección es seleccionada de entre la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y angiopatía amiloide cerebral (CAA).
5. Una molécula de acuerdo con el uso de la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el que dicha enfermedad de Alzheimer es una enfermedad de Alzheimer pre-clínica.
- 15 6. Una molécula de acuerdo con el uso de la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el que dicha enfermedad de Alzheimer es una enfermedad de Alzheimer clínica.
7. Una composición que comprende la molécula de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8 que es adecuada para su administración subcutánea.