

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 135**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2011 E 11807457 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2593475**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti-ADDL y usos del mismo**

30 Prioridad:

14.07.2010 US 364210 P

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

06.06.2016

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**GASPAR, RENEE C.;
SHUGHRUE, PAUL J.;
WANG, FUBAO;
WANG, WEIRONG;
ZHANG, NINGYAN;
ZHAO, WEI-QIN;
MCCAMPBELL, ALEXANDER y
XU, MIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 573 135 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti-ADDL y usos del mismo.

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La invención proporciona también composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales y procedimientos de uso de las composiciones como biomarcadores o para diagnóstico y uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a amiloide beta (A β) y ligandos difusibles derivados de A β (ADDL).

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La enfermedad de Alzheimer (EA) está caracterizada por la pérdida progresiva de función cognitiva y la acumulación de placas de amiloide beta (A β) en regiones asociadas al aprendizaje y la memoria. Aunque se creía hace tiempo que las placas de A β desempeñaban un papel básico en la patogénesis de la EA, un conjunto creciente de evidencias sugiere que los ligandos difusibles derivados de A β (ADDL) pueden ser responsables de la disfunción neuronal y el deterioro cognitivo asociados a la enfermedad (Walsh y Selkoe, 2004, *Protein Pept. Lett.*, 11: 213-228). Los ADDL son oligómeros solubles pequeños de A β que son abundantes en cerebros con EA pero no en normales (McLean y col., 1999, *Ann. Neurol.*, 46: 860-866; Gong y col., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 10417-10422). Estudios *in vitro* han mostrado que los ADDL, aislados de cerebro con EA o preparaciones sintéticas, se unen a una subpoblación de neuronas corticales e hipocámpicas (Gong y col., 2003; Klein y col., 2004, *Neurobiol. Aging*, 25: 569-580; Lacor y col., 2004, *J. Neurosci.*, 24: 10191-10200; Shughrue y col., 2010, *Neurobiol. Aging*, 31: 189-202), aunque se detectaba poca o ninguna unión con preparaciones fibrilares o monoméricas de A β (Lacor y col., 2004; Hepler y col., 2006, *Biochemistry*, 45: 15157-15167). Además, la unión de ADDL a neuronas puede atenuarse tanto por anticuerpos policlonales (Gong y col., 2003) como monoclonales (Lee y col., 2006, *J. Biol. Chem.*, 281: 4292-4299; De Felice y col., 2007, *Neurobiol. Aging* 29: 1334-1347; Shughrue y col., 2010) generados contra ADDL.

En modelos de roedor, la administración central de ADDL induce déficit de la potenciación a largo plazo (LTP) y la formación de memoria en roedores (Walsh y col., 2002, *Nature*, 416: 535-539; Cleary y col., 2004, *Nat. Neurosci.*, 8: 79-84; Klyubin y col., 2005, *Nat. Med.*, 11: 556-561). El efecto de los oligómeros sobre la LTP se atenuaba cuando se coadministraban los ADDL con un anticuerpo anti-A β o se administraban a animales que se habían vacunado con el péptido A β (Rowan y col., 2004, *Exp. Gerontol.*, 39: 1661-1667). En un modelo transgénico de EA, tal como ratones transgénicos que producen proteína precursora de amiloide humano (hAPP), se han observado déficit cognitivos asociados a la edad con niveles elevados de ADDL (Westerman y col., 2002, *J. Neurosci.*, 22: 1858-1867; Ashe, 2005, *Biochem. Soc. Trans.*, 33: 591-594; Lee y col., 2006; Lesne y col., 2006, *Nature*, 440: 352-357). Cuando se trataron los ratones con hAPP con un anticuerpo anti-ADDL, se observó una mejora significativa en el rendimiento cognitivo sin un descenso simultáneo de la carga de placa de A β (Lee y col., 2006). En conjunto, estos hallazgos sugieren que los ADDL, y no las placas de A β , son los responsables principales de la alteración cognitiva y que el uso de anticuerpos anti-ADDL puede probarse eficaz en el tratamiento de EA. Véanse también los documentos US2006/0228349; US 7731.962, WO 2007/050359; US2007/0218499, WO 2006/014478; US 7.700.099; US 2008/01758835 y WO 2006/055178.

Por consiguiente, existe la necesidad de anticuerpos terapéuticos selectivos de ADDL para la prevención y el tratamiento de EA. La presente invención satisface esta necesidad.

45 **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención está dirigida a un anticuerpo aislado designado 19.3, o a un fragmento del mismo, capaz de reconocer diferencialmente una conformación multidimensional de uno o más ligandos difusibles derivados de amiloide β (ADDL) para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a los ADDL, tales como enfermedad de Alzheimer (EA). La presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo aislado de la invención, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticamente activos, vehículos o diluyentes.

La presente invención está también dirigida a procedimientos de uso del anticuerpo aislado designado 19.3 tales como procedimientos para detectar ADDL en una muestra, por ejemplo mediante la inhibición del ensamblaje de ADDL, para identificar agentes terapéuticos que previenen la unión de ADDL a neuronas y al uso para atenuar los síntomas de una enfermedad asociada a los ADDL, y como biomarcador para uso en el diagnóstico de una enfermedad asociada a los ADDL o para la detección de ADDL en una muestra.

60 **BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 es una representación gráfica de la unión por ELISA de un panel de anticuerpos anti-ADDL humanizados

(h3B3) y madurados por afinidad (14.2, 7.2, 11.4, 9.2, 13.1, 17.1 y 19.3) y tres anticuerpos comparativos (Comp 1, 2 y 3) a A β monomérico, ADDL y A β fibrilar. Se determinó el fondo de este ensayo retirando el anticuerpo de captura de ELISA (sin AcM). Las barras de error representan el error estándar de la media.

5 La Figura 2 es una representación gráfica de la unión por ELISA del anticuerpo anti-ADDL 19.3 y el anticuerpo 3B3 a ADDL o A β monomérico (A β ₁₋₄₀) evaluada con una curva de titulación de 11 puntos.

10 La Figura 3 es una representación gráfica de la capacidad de los anticuerpos anti-ADDL 19.3 y 3B3 de bloquear la unión de ADDL a células neuronales hipocámpicas primarias después de preincubación con concentración creciente del anticuerpo. La capacidad del anticuerpo anti-ADDL 19.3 de bloquear la unión de ADDL a neuronas se atenúa después de la desnaturalización térmica del anticuerpo. Las barras de error representan el error estándar de la media.

15 Las Figuras 4A-4C son representaciones gráficas de la unión por ELISA a ADDL del anticuerpo anti-ADDL 19.3 (designado como WT en la Figura 4A) y de dos anticuerpos anti-ADDL derivados de 19.3 (Figuras 4B y 4C) después de incubación durante hasta un mes a temperaturas variables para evaluar la estabilidad del anticuerpo. Los anticuerpos anti-ADDL derivados de 19.3 comprendían una única sustitución aminoacídica de Asn33 en CDR1 de cadena ligera a Ser33 (19.3S33) o Thr33 (19.3T33) (SEQ ID NO: 55 y 56, respectivamente). La sustitución de Asn33 por S33 (Figura 4B) o T33 (Figura 4C) daba como resultado una estabilidad del anticuerpo mejorada frente al anticuerpo 19.3 original.

20 La Figura 5 es una representación gráfica de la unión y disociación de anticuerpos anti-ADDL a FcRn humano inmovilizado cuando se valora con Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El sensorgrama ajustado muestra una unión inicial a pH 6,0 y después la disociación de los anticuerpos a pH 7,3 a partir de 180 segundos. Se insertó un punto indicador (estabilidad) a los 5 segundos después del final de la unión a pH 6,0 y se calculó el “% unido” como $UR_{\text{estabilidad}}/UR_{\text{unión}}$ (%).

25 La Figura 6A muestra el alineamiento de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo anti-ADDL 19.3 con una línea germinal humana con las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) indicadas en negrita. La Figura 6B es un modelo tridimensional de las regiones variables pesada y ligera del anticuerpo 19.3 que muestra la localización de las CDR.

30 La Figura 7 es una representación gráfica del perfil farmacocinético (PK) de los anticuerpos anti-ADDL 19.3 y 3B3 evaluado en ratones con FcRn humano 276 heterocigóticos (Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)) después de una única administración intravenosa (IV) de 10 mg/kg. Se midió la concentración de anticuerpo en diversos intervalos temporales para determinar la semivida ($t_{1/2}$) del anticuerpo libre (19.3: 77 ± 6 horas; 3B3 respectivamente: 29 ± 9 horas).

35 La Figura 8 es una representación gráfica de la PK del anticuerpo anti-ADDL 19.3 (en suero) valorada en 6 monos Rhesus después de la administración de una dosis en bolo intravenoso (IV) o subcutánea (SC) de 5 mg/kg. Se determinó una semivida ($t_{1/2}$) de 254 ± 28 (274 ± 9) horas después de la administración IV y de 204 ± 49 (219 ± 52) horas después de la dosificación SC.

40 La Figura 9 es una representación gráfica de la PK del anticuerpo anti-ADDL 19.3 valorada en líquido cefalorraquídeo (LCR) de primates (tres monos Rhesus macho) usando un modelo Rhesus con puerto en la cisterna magna después de la administración de una dosis en bolo IV de 5 mg/kg. Aproximadamente a las 48 horas después de la dosis, el anticuerpo anti-ADDL 19.3 estaba presente en el LCR al 0,1 % de la concentración en suero.

45 Las Figuras 10A-10D son representaciones de la capacidad del anticuerpo anti-ADDL 19.3, frente a dos anticuerpos comparativos (Comp 1 y Comp 2), de cruzar la barrera hematoencefálica en un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa proteína precursora de amiloide humana (hAPP). Se inyectaron a los ratones por vía intravenosa (IV) anticuerpo anti-ADDL 19.3 marcado con ¹²⁵I o anticuerpo comparativo, y se recogieron muestras de sangre, LCR y cerebro 2 horas después de la dosis. Tras la valoración de la distribución de la radiactividad, estaba presente un 0,02 % del anticuerpo anti-ADDL 19.3 en el LCR (Figura 10A), mientras que se observaba un 0,19 % en el cerebro (Figura 10B). Se observaron niveles similares con los dos anticuerpos comparativos. El análisis inmunocitoquímico demostraba la localización del anticuerpo anti-ADDL 19.3 (Figura 10C, flechas) y era visible una concentración del anticuerpo anti-ADDL 19.3 con placas (Figura 10D). El anticuerpo anti-ADDL 19.3 era capaz de penetrar en el cerebro y unirse a ADDL.

50 Las Figuras 11A-11C son representaciones de la capacidad del anticuerpo anti-ADDL 19.3 de bloquear la deposición de ADDL en placas en crecimiento en un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa hAPP. Los ADDL biotinilados (bADDL) infundidos en el hipocampo de ratones de 12 meses de edad durante 4 semanas (una inyección por semana) (Figura 11A) marcaban las placas existentes (vehículo solo: Figura 11B; anticuerpo 19.3: Figura 11C, anillo). Se usó el análisis inmunocitoquímico para valorar la deposición de nuevos materiales (ADDL)

(Figuras 11B y 11C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención está dirigida al anticuerpo designado 19.3, o a un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo designado 19.3, que se unen a ligandos difusibles derivados de amiloide β ($A\beta$) (ADDL), concretamente a anticuerpos anti-ADDL, y que atenúan la unión de ADDL a neuronas. Los resultados de un ensayo cuantitativo basado en células revelaron que los anticuerpos anti-ADDL preferentemente se unían a ADDL, reducían la unión de ADDL a neuronas hipocámpicas, cruzaban la barrera hematoencefálica y tenían un perfil farmacocinético (PK) mejorado.

En una realización, la presente invención está dirigida a un anticuerpo aislado, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a ligandos difusibles derivados de amiloide β (ADDL), que comprende:

15 (a) una región variable de cadena ligera que comprende,

(i) una CDR1 que tiene la secuencia Arg-Ser-Ser-Gln-Ser-Ile-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-Glu (SEQ ID NO: 1),

20 (ii) una CDR2 que tiene la secuencia Lys-Ala-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser (SEQ ID NO: 2), y

(iii) una CDR3 de SEQ ID NO: 10; y

(b) una región variable de cadena pesada que comprende,

25 (i) una CDR1 que tiene la secuencia Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Phe-Gly-Met-His (SEQ ID NO: 4),

(ii) una CDR2 que tiene la secuencia Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Ser-Ser-Thr-Ile-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Thr-Val-Lys-Gly (SEQ ID NO: 5), y

(iii) una CDR3 que tiene la secuencia Gly-Ile-Thr-Thr-Ala-Leu-Asp-Tyr (SEQ ID NO: 6).

30 Se da a conocer además un anticuerpo aislado que se une a ADDL, concretamente un anticuerpo anti-ADDL o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una región CDR3 variable de cadena ligera, que se selecciona del grupo consistente en 17.1 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Arg-Val-Pro-Ala-Ser (SEQ ID NO: 7), 14.2 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Arg-Val-Pro-Pro-Gly (SEQ ID NO: 8), 13.1 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Lys-Ala-His-Pro-Ser (SEQ ID NO: 9), 19.3 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Arg-Leu-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 10), 7.2 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Tyr-Ala-Pro-Pro-Gly (SEQ ID NO: 11), 9.2 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Arg-Ala-Pro-Pro-Phe (SEQ ID NO: 12) y 11.4 que tiene la secuencia Phe-Gln-Gly-Ser-Arg-Val-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 13). En una subrealización, la región CDR3 variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 10.

40 En aún otra realización de la presente invención, el anticuerpo anti-ADDL aislado comprende además una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 17.

En todavía otra realización de la presente invención, el anticuerpo anti-ADDL aislado comprende además una región constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 21.

45 En otra realización de la presente invención, el anticuerpo anti-ADDL aislado es un anticuerpo monoclonal.

Es otra realización de la presente invención una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Es otra realización de la presente invención un procedimiento *in vitro* para atenuar la unión de ADDL a una neurona que comprende poner en contacto la neurona con un anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno de mismo, de modo que se atenúe la unión de ligandos difusibles derivados de $A\beta$ a la neurona.

55 Es otra realización de la presente invención un procedimiento para inhibir el ensamblaje de ADDL que comprende poner en contacto una muestra que contiene los péptidos 1-42 del amiloide β con un anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibiendo así el ensamblaje de ADDL.

60 Es otra realización de la presente invención un procedimiento para inhibir la fosforilación de la proteína tau en Ser202/Thr205 que comprende poner en contacto una muestra que contiene una proteína tau con un anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibiendo así la fosforilación de la proteína tau en Ser202/Thr205.

Se da a conocer además un procedimiento para atenuar los síntomas de una enfermedad asociada a ADDL que comprende administrar una cantidad efectiva a un paciente necesitado de ello de la composición farmacéutica que

comprende un anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Es otra realización de la presente invención un procedimiento para identificar un presunto agente terapéutico que atenúa la unión de ligandos difusibles derivados de amiloide β (ADDL) a neuronas, que comprende:

- (a) poner en contacto una composición que comprende una neurona con ADDL en presencia de un agente;
- (b) poner en contacto la composición con el anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y
- (c) detectar la cantidad de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido en presencia del agente,

donde un descenso en la cantidad de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido en presencia del agente, en comparación con la cantidad de anticuerpo unido en ausencia del agente, indica que el agente es un presunto agente terapéutico para atenuar la unión de ADDL a neuronas.

Es otra realización de la presente invención un procedimiento para detectar ADDL en una muestra que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y determinar la presencia de un complejo que comprende los ADDL y dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

Es otra realización de la presente invención un procedimiento para diagnosticar una enfermedad asociada a ADDL que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y determinar la presencia de un complejo que comprende los ADDL y dicho anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno, donde la presencia de dicho complejo es un diagnóstico de enfermedad asociada a ADDL.

Es aún otra realización de la presente invención un kit para detectar ADDL que comprende un anticuerpo anti-ADDL aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a ADDL.

Son conocidos en la materia anticuerpos monoclonales que reconocen diferencialmente conformaciones multidimensionales de ligandos difusibles derivados de $A\beta$ (ADDL) (véanse la patente de EE.UU. n° 7.780.963, la patente de EE.UU. n° 7.731.962 y la patente de EE.UU. n° 7.811.563), y se ha mostrado que reducen la unión de ADDL a neuronas en ensayos basados en células. Los anticuerpos anti-ADDL pueden distinguir entre extractos de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer (EA) y de control, pueden identificar oligómeros endógenos en secciones de cerebro con EA y en células hipocámpicas y pueden neutralizar los ADDL endógenos y sintéticos en solución. Los anticuerpos anti-ADDL se unen específicamente a una o más conformaciones multidimensionales de los ADDL y se unen a ADDL particulares derivados de la oligomerización de $A\beta_{42}$, aunque tienen una afinidad reducida por otros péptidos de $A\beta$, incluyendo $A\beta_{1-40}$.

Se dan a conocer ahora anticuerpos anti-ADDL, específicamente los anticuerpos 17.1, 14.2, 13.1, 19.3, 19.3T33, 19.3S33, 7.2, 9.2 y 11.4, que se unen preferentemente a ADDL y que se han caracterizado en su especificidad y selectividad por ADDL. De forma importante, la especificidad y selectividad de estos anticuerpos anti-ADDL de la presente invención no era predecible a partir del epítipo lineal de $A\beta$ al que se unían, ni era predecible esta actividad a partir de su capacidad de detectar ADDL por transferencia Western, o a partir de su capacidad de detectar ADDL inmunoteñidos unidos a neuronas. Además, la capacidad diferencial de los anticuerpos anti-ADDL de la presente invención de neutralizar ADDL y bloquear la unión a neuronas hipocámpicas primarias apoya la creencia de que los anticuerpos anti-ADDL actúan mediante la unión a un epítipo conformacional más relevante que previene la unión de ADDL a neuronas. Una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-ADDL 19.3, no solo bloqueaba la unión de ADDL a neuronas primarias, sino que también reducía los cambios inducidos por ADDL en la morfología de la espina hipocámpica, un indicativo de que la impedancia de la unión neuronal de ADDL tiene ramificaciones fisiológicas significativas, por ejemplo, supervivencia neuronal, conectividad neuronal y transducción de señal. El anticuerpo anti-ADDL 19.3 tenía también un perfil farmacocinético (PK) mejorado, en comparación con un anticuerpo anti-ADDL anteriormente conocido, 3B3, cuando se valoraba en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, cuando se administraba a ratones transgénicos que sobreexpresan una forma humana de proteína precursora de amiloide (hAPP), se mostró que el anticuerpo anti-ADDL 19.3 penetra la barrera hematoencefálica y se concentra en el cerebro. Puesto que los ADDL están localizados en el cerebro y actúan allí afectando negativamente a la función neuronal, un especialista en la materia apreciaría y reconocería que la penetración y concentración de anticuerpo en el cerebro serían beneficiosas para inmunoterapia. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que los anticuerpos anti-ADDL selectivos, tales como el anticuerpo 19.3, pueden bloquear la unión de ADDL a neuronas hipocámpicas, que están implicadas críticamente en el aprendizaje y la memoria.

La utilidad de los anticuerpos anti-ADDL para el tratamiento de EA está basada en un conjunto creciente de evidencias que sugieren que los ADDL, y no las placas amiloides *per se*, desempeñan un papel fundamental en el deterioro cognitivo asociado a esta enfermedad (Walsh y Selkoe, 2004, Protein Pept. Lett., 11: 213-228). Los ADDL son elevados en el cerebro con EA e inducen déficit de los criterios de valoración conductuales y electrofisiológicos

cuando se administran por vía central a roedores (Walsh, y col., 2002, Nature, 416: 535-539; Cleary, y col., 2004, Nat. Neurosci., 8: 79-84; Klyubin, y col., 2005, Nat. Med., 11: 556-561; Balducci, y col., 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107: 2295-2300). Se han observado también déficit de aprendizaje y memoria en un modelo de ratón que expresa hAPP, con el inicio de la alteración asociado a niveles elevados de ADDL (Westerman, y col., 2002, J. Neurosci., 22: 1858-1867; Ashe, 2005, Biochem. Soc. Trans., 33: 591-594; Lee, y col., 2005, J. Biol. Chem., 281: 4292-4299; Lesne, y col., 2006, Nature, 440: 352-357). Aunque los eventos celulares y subcelulares que median estos efectos sobre la cognición no se entienden totalmente, resulta evidente que los ADDL se unen a las terminales sinápticas localizadas en los procesos dendríticos de neuronas hipocámpicas (Lacore, y col., 2004, J. Neurosci., 24: 10191-1022) y alteran la morfología y el número de espinas dendríticas (Lacor y col., 2007, J. Neurosci., 27: 796-807; Shankar, y col., 2007, J. Neurosci., 27: 2866-2875; Shughrue, y col., 2010, Neurobiol. Aging, 31: 189-202). El hallazgo de que los ADDL se unen tanto a neuronas GABAérgicas como de glutamato en el hipocampo (Shughrue, y col., 2010), neuronas implicadas críticamente en el aprendizaje y la memoria, lo que da como resultado la internalización de los receptores de AMPA (Zhao, y col., 2010, J. Biol. Chem., 285: 7619-7632), apoya además la creencia de que los ADDL modulan directa o indirectamente estos sistemas neurotransmisores (véase, por ejemplo, Venkitaramani, y col., 2007, J. Neurosci., 27: 11832-11837).

En la presente invención, se valoró en un panel de anticuerpos anti-ADDL derivados del anticuerpo anti-ADDL 3B3 (patente de EE.UU. nº 7.780.963 y patente de EE.UU. nº 7.811.563) su capacidad de bloquear la unión de ADDL a neuronas hipocámpicas primarias. Se humanizaron entonces los anticuerpos monoclonales seleccionados y se maduraron por afinidad para caracterización adicional. Se valoraron además los anticuerpos principales, seleccionados por su capacidad de unirse a ADDL, a una única concentración usando un ELISA de tres vías para determinar la unión de anticuerpo a A β monomérico, ADDL y A β fibrilar. Como se muestra en la Figura 1, 6 de los 7 anticuerpos anti-ADDL madurados por afinidad, específicamente los anticuerpos 14.2, 7.2, 11.4, 13.1, 17.1 y 19.3, preferían los ADDL en comparación con A β monomérico y A β fibrilar. Posteriormente, se usaron una curva de titulación de 11 puntos y ELISA para establecer la afinidad de unión de los anticuerpos anti-ADDL a ADDL y A β monomérico (A β ₁₋₄₀) en un amplio intervalo de concentraciones. Como se muestra en la Figura 2, los anticuerpos anti-ADDL 3B3 y 19.3 eran altamente selectivos de ADDL. Además, se compararon los anticuerpos en un ensayo de unión basado en células para determinar la capacidad de los anticuerpos de bloquear la unión de ADDL a neuronas. Como se muestra en la Figura 3, se añadieron los ADDL, preincubados con concentraciones crecientes de los anticuerpos anti-ADDL 3B3 y 19.3, a neuronas hipocámpicas primarias y se usó una curva de titulación para mostrar cuantitativamente la capacidad del anticuerpo de bloquear la unión de ADDL a neuronas. Tomados en conjunto, estos resultados muestran que los anticuerpos anti-ADDL atenúan en gran medida la unión neuronal en un formato basado en células.

Se realizó una valoración de la secuencia aminoacídica para identificar los sitios potenciales de desamidación. Los residuos de asparagina y ácido aspártico presentes en las CDR de los anticuerpos terapéuticos son conocidos por experimentar desamidación y formación de isoaspartato (Valsak y Ionescu, 2008, Curr. Pharm. Biotech., 9: 468-481; Aswad y col., 2000, J. Pharm. Biomed. Anal., 21: 1129-1136), cuya formación puede alterar la potencia de unión de un anticuerpo y, a su vez, reducir la efectividad del anticuerpo para uso como terapia. Por tanto, los especialistas en la materia reconocerían y apreciarían que la presencia de una asparagina o un ácido aspártico en las CDR del anticuerpo 19.3 no sería deseable. Por consiguiente, los solicitantes alteraron el residuo de asparagina en la posición 33 de la CDR1 de cadena ligera para optimizar la estabilidad del anticuerpo anti-ADDL 19.3 (Tabla 4B). Se produjeron derivados del anticuerpo 19.3 con la sustitución de serina (SEQ ID NO: 55), treonina (SEQ ID NO: 56) o ácido glutámico (SEQ ID NO: 67) por la asparagina en posición 33 (SEQ ID NO: 1) en CDR1. Se generó también la sustitución de ácido aspártico (SEQ ID NO: 68) por la asparagina en posición 33 como control. Estos cambios eliminarán la posibilidad de desamidación de la asparagina en posición 33 de la CDR1. Se generaron los derivados de 19.3 como se describe en el Ejemplo 3 y se caracterizaron como se describe en el Ejemplo 4 como derivados con las sustituciones de serina (SEQ ID NO: 55), treonina (SEQ ID NO: 56), ácido glutámico (SEQ ID NO: 67) y ácido aspártico (SEQ ID NO: 68), para evaluar la estabilidad de los nuevos constructos. Como se muestra en las Figuras 4B y 4C, respectivamente, dos derivados representativos, 19.3S33 (SEQ ID NO: 55) y 19.3T33 (SEQ ID NO: 56), tenían una estabilidad de unión mejorada después de la incubación durante un mes a temperaturas variables. Se proponen otras sustituciones aminoacídicas en la CDR1 de cadena ligera para la asparagina en posiciones 33 y 35 (SEQ ID NO: 53) y en la CDR2 de cadena ligera para la asparagina en posición 58 (SEQ ID NO: 54) en las Tablas 4B y 4C para evaluación adicional.

Para determinar la farmacocinética de los anticuerpos anti-ADDL madurados por afinidad de la presente invención, se realizaron una serie de estudios *in vitro* e *in vivo*. Se ha mostrado que la unión de anticuerpos al receptor FcRn a pH 6,0 es predictiva de la semivida del anticuerpo en seres humanos (Zalevsky, y col., 2010, Nat. Biotech., 28(2): 157-159) y a pH 7,3 (USSN 61/307.182). Se valoró la unión y disociación de los anticuerpos anti-ADDL de la presente invención a FcRn humano inmovilizado con un análisis de interacción sin etiqueta, tal como el ofrecido por Biacore™ Life Sciences, Biacore™ T-100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se usa un sensorgrama ajustado para mostrar la unión inicial a pH 6,0 y la disociación después de los anticuerpos a pH 7,3 a partir de 180 segundos. Se insertó un punto indicador (estabilidad) a los 5 segundos después del final de la unión a pH 6,0 y se calculó el "% unido" como $UR_{\text{estabilidad}}/UR_{\text{unión}}$ (%). Como se muestra en la Figura 5, la velocidad de disociación para 3B3

humanizado era notablemente más lenta que la de los 7 anticuerpos anti-ADDL de la presente invención, que incluían el anticuerpo 19.3, y 3 anticuerpos comparativos. Como una velocidad de disociación lenta se cree que es indicativa de una mala PK *in vivo*, se realizó un estudio adicional *in vivo* en ratones transgénicos de FcRn (ratones con FcRn humano 276 heterocigóticos, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Cuando se procuró a los ratones transgénicos de FcRn el anticuerpo anti-ADDL 3B3 o 19.3 10 mg/kg por vía intravenosa (IV), se determinó una diferencia significativa en la farmacocinética. Como se muestra en la Figura 7, la semivida ($t_{1/2}$) del anticuerpo anti-ADDL 3B3 era relativamente corta (29 ± 9 horas), lo que era concordante con la predicción de los datos *in vitro* de Biacore™, mientras que la semivida del anticuerpo anti-ADDL 19.3 era significativamente más larga (77 ± 6 horas). Generalmente, una mala PK, como la observada con el anticuerpo 3B3, descartaría un desarrollo adicional de un anticuerpo para uso como terapia debido a su corta biodisponibilidad.

Para confirmar la semivida predicha del anticuerpo anti-ADDL 19.3 en primates, se realizó un estudio de farmacocinética en primates para el anticuerpo en una cohorte de monos Rhesus con puerto en la cisterna magna. Se dosificó a los animales una única inyección en bolo intravenoso (IV) o subcutánea (SC) del anticuerpo anti-ADDL 19.3 (5 mg/kg) y se recogieron muestras de sangre después de la administración de anticuerpo. Al mismo tiempo, se recogieron muestras de LCR del puerto de la cisterna magna a intervalos espaciados y se determinó la concentración del anticuerpo anti-ADDL 19.3 en suero y LCR con un ensayo ELISA anti-IgG humana. Cuando se administró a los animales el anticuerpo anti-ADDL 19.3 mediante una única inyección en bolo IV, se observó una $t_{1/2}$ de 254 ± 28 horas (Figura 8), mientras que se observó una $t_{1/2}$ de 204 ± 49 horas para la administración subcutánea. Además, los solicitantes encontraron que el anticuerpo anti-ADDL 19.3 era capaz de cruzar al LCR de primate, donde aumentaba de concentración durante las primeras 48 horas y alcanzaba un máximo de aproximadamente un 0,1 % del anticuerpo dosificado (Figura 9).

En un intento de establecer la cantidad de anticuerpo que penetra la barrera hematoencefálica y entra en el LCR y el cerebro, se marcaron con 125 I el anticuerpo anti-ADDL 19.3 y dos anticuerpos comparativos (Comp 1 y Comp 2) y se administraron a ratones ancianos (12 meses de edad) que sobreexpresan hAPP, un modelo de EA en roedores. 2 horas después de la dosificación IV, se observó aproximadamente un 0,02 % de anticuerpo 19.3 en el LCR (Figura 10A), mientras que se observó aproximadamente un 0,19 % del anticuerpo 19.3 en el cerebro (Figura 10B). Se observaron niveles similares para los dos anticuerpos comparativos (Figura 10A y 10B). Cuando se llevó a cabo el análisis inmunocitoquímico en las secciones de cerebro de los ratones dosificados y se determinó la localización del anticuerpo anti-ADDL 19.3 (flecha en la Figura 10C), se observó una concentración del anticuerpo asociada a la deposición de A β en placas (Figura 10D). Esto demostraba que el anticuerpo anti-ADDL 19.3 penetraba en el LCR y se concentraba en el cerebro. Recientemente, se ha mostrado que los ADDL exógenos se depositaban en placas cuando se administraban a ratones que sobreexpresan hAPP (Gaspar, y col., 2010, Exp. Neurol., 223: 394-400). Por tanto, los hallazgos de la presente memoria confirmaron que el anticuerpo anti-ADDL 19.3 localizado se unía a ADDL en circulación asociados a placas.

Para evaluar adicionalmente la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-ADDL, se valoró la capacidad del anticuerpo 19.3 de bloquear la deposición de ADDL en placas en crecimiento en ratones transgénicos de hAPP después de 4 infusiones semanales de ADDL biotinilados (bADDL) en el hipocampo de ratones de 12 meses de edad para marcar las placas existentes (Figura 11A). Los animales recibieron después 4 infusiones intravenosas semanales de anticuerpo 19.3 (Figura 11A). Se valoró la deposición de material nuevo (ADDL) en placas en crecimiento mediante análisis inmunocitoquímicos. Como se observa en las Figuras 11B y 11C, el anticuerpo anti-ADDL 19.3 reducía significativamente la deposición de ADDL en la periferia de las placas existentes (Figura 11C) en comparación con ratones tratados con vehículo solo (Figura 11B). Tomados en conjunto, estos resultados demostraban que un anticuerpo anti-ADDL, específicamente el anticuerpo 19.3, era capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, unirse a ADDL y bloquear la deposición de material nuevo en placas en crecimiento.

La unión de ADDL puede tener también efectos a largo plazo sobre las neuronas. Estudios recientes han mostrado que la unión de ADDL a neuronas hipocámpicas puede iniciar una cascada de señalización que da como resultado la fosforilación de tau (De Felice, y col., 2006, Neurobiol. Aging, 29: 394-400). Se ha mostrado también que un componente de la cascada de señalización, GSK-3 β , se modula por la unión de ADDL *in vivo* e *in vitro* (Ma, y col., 2006, J. Neurosci. Res., 83: 374-384). Ma, y col., 2006, encontraron que la inmunización pasiva de ratones con hAPP con un anticuerpo que reducía los ADDL reducía también los niveles de GSK-3 β y la fosforilación de tau en la corteza. Este hallazgo apoya un nexo entre A β y tau fosforilada y sugiere que la unión de ADDL puede desencadenar eventos que conduzcan a la agregación intracelular de tau. Además, los datos sugieren que los anticuerpos que previenen la unión de ADDL a neuronas y la pérdida asociada de espinas sinápticas, tales como los anticuerpos de la presente invención, podrían mejorar los resultados clínicos cognitivos y/o patológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer y enfermedades relacionadas.

Se han generado ahora anticuerpos monoclonales que reconocen diferencialmente conformaciones multidimensionales de ligandos difusibles derivados de A β , concretamente ADDL. Estos anticuerpos se han humanizado y, en algunas realizaciones, madurado por afinidad. Los anticuerpos distinguen ventajosamente entre extractos de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer y de control, e identifican oligómeros endógenos en

- secciones de cerebro con enfermedad de Alzheimer y en células hipocámpicas cultivadas. Además, los anticuerpos de la presente invención neutralizan los ADDL endógenos y sintéticos en solución. Los denominados ADDL "sintéticos" se producen *in vitro* mezclando A β 1-42 purificado en condiciones que generen ADDL. Véase la patente de EE.UU. n° 6.218.506. Los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria exhiben un alto grado de selectividad por ADDL, con una detección mínima de especies de A β monoméricas. Además, estos anticuerpos bloquean diferencialmente la capacidad de las preparaciones que contienen ADDL de unirse a cultivos primarios de neuronas hipocámpicas de rata y líneas celulares de neuroblastoma inmortalizadas, y bloquean también el ensamblaje de ADDL. Este hallazgo demuestra que estos anticuerpos poseen una capacidad diferencial de reconocer una conformación multidimensional de los ADDL a pesar de un reconocimiento de secuencia lineal y afinidades similares. Puesto que los ADDL son conocidos por asociarse con un subconjunto de neuronas y perturbar la función neuronal normal, los anticuerpos de esta invención encuentran uso en la prevención de la unión de ADDL a neuronas y el ensamblaje de ADDL y, a su vez, pueden usarse para el tratamiento de enfermedades relacionadas con los ADDL, incluyendo enfermedad de Alzheimer.
- Por consiguiente, se da a conocer un anticuerpo aislado que reconoce diferencialmente una o más conformaciones multidimensionales de los ADDL. Un anticuerpo "aislado" de la presente invención hace referencia a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos. Sin embargo, la molécula puede incluir algunos agentes o restos adicionales que no afecten nocivamente a las características básicas del anticuerpo (por ejemplo, especificidad de unión, actividad neutralizante, etc.).
- Un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a una o más conformaciones multidimensionales de los ADDL se une a ADDL particulares derivados de la oligomerización de A β 1-42, pero no reacciona de forma cruzada con otros péptidos de A β , a saber A β 1-12, A β 1-28, A β 1-40 y A β 12-28, como se determina por análisis de transferencia Western como se da a conocer en la presente memoria, y se une preferencialmente a ADDL en solución. La unión específica entre dos entidades hace referencia generalmente a una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M $^{-1}$. Se desean afinidades mayores de 10^8 M $^{-1}$ para conseguir una unión específica.
- En realizaciones particulares, se crea también un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a una conformación multidimensional de uno o más ADDL contra, concretamente, un animal inmunizado con conformaciones multidimensionales de ADDL. En otras realizaciones, se crea un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a una conformación multidimensional de uno o más ADDL contra un péptido de formación de bajo número de unidades tal como A β 1-42[N1e35-Dpro37].
- El término "epítipo" hace referencia a un sitio en un antígeno al que responden linfocitos B y/o T o a un sitio en una molécula contra el que se producirá un anticuerpo y/o al que se unirá un anticuerpo. Por ejemplo, un epítipo puede reconocerse por un anticuerpo que define el epítipo.
- Un epítipo lineal es un epítipo donde la secuencia aminoacídica primaria comprende el epítipo reconocido. Un epítipo lineal incluye típicamente al menos 3, y más habitualmente al menos 5, por ejemplo de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, aminoácidos en una secuencia única.
- Un epítipo conformacional, en contraposición con un epítipo lineal, es un epítipo donde la secuencia primaria de los aminoácidos que comprenden el epítipo no es el único componente de definición del epítipo reconocido (por ejemplo, un epítipo donde la secuencia primaria de aminoácidos no se reconoce necesariamente por el anticuerpo que define el epítipo). Típicamente, un epítipo conformacional engloba un número aumentado de aminoácidos respecto a un epítipo lineal. Con respecto al reconocimiento de epítipos conformacionales, el anticuerpo reconoce una estructura tridimensional del péptido o proteína. Por ejemplo, cuando la molécula de proteína se pliega formando una estructura tridimensional, ciertos aminoácidos y/o el esqueleto peptídico que forma el epítipo conformacional se yuxtaponen, posibilitando que el anticuerpo reconozca el epítipo. Los procedimientos de determinación de la conformación de epítipos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo cristalografía de rayos X, espectroscopia de resonancia magnética nuclear bidimensional y espectroscopia de marcaje de espín dirigida a sitio y paramagnética electrónica. Véase, por ejemplo, "Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology" (1996) vol. 66, Morris (Ed.).
- Los ligandos difusibles derivados de amiloide β o ADDL hacen referencia a oligómeros solubles de A β 1-42 que están compuestos deseablemente por agregados de menos de 8 o 9 péptidos A β 1-42 y se encuentran asociados a la enfermedad de Alzheimer. Esto está en contraposición con los intermedios de agregación de alto peso molecular, que forman tiras de micelas que conducen a la formación de fibrilla.
- Como se ejemplifica en la presente memoria, el anticuerpo designado 19.3 de la presente invención se une a o reconoce al menos una conformación multidimensional de un ADDL. En realizaciones particulares, los anticuerpos se unen al menos a dos, al menos a tres o al menos a cuatro conformaciones multidimensionales de un ADDL. Las conformaciones multidimensionales de los ADDL pretenden englobar dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros, decámeros, etc. como se definen por análisis a través de PAGE-

SDS. Debido a que las denominaciones trímero, tetrámero, etc. pueden variar con el procedimiento de ensayo empleado (véase, p.ej., Bitan, y col., 2005, *Amyloid*, 12: 88-95), la definición de trímero, tetrámero y similares, como se usan en la presente memoria, es según el análisis de PAGE-SDS. Para ilustrar las capacidades de unión diferencial de los anticuerpos de la presente memoria, se ha encontrado que ciertos anticuerpos reconocerán una conformación multidimensional, por ejemplo los tetrámeros de ADDL (patente de EE.UU. n° 7.780.963, anticuerpos de murino 2D6 y 4E2), mientras que otros anticuerpos reconocen varias conformaciones multidimensionales, por ejemplo trímeros y tetrámeros de ADDL (patente de EE.UU. n° 7.780.963, anticuerpos de murino 2A10, 2B4, 5F10 y 20C2 y anticuerpo humanizado 20C2). Como tal, el anticuerpo de la presente invención tiene características específicas de oligómeros. En realizaciones particulares, una conformación multidimensional de un ADDL está asociada a una estructura polipeptídica específica que da como resultado un epítipo conformacional que se reconoce por un anticuerpo de la presente invención. En otras realizaciones, un anticuerpo se une específicamente a una conformación multidimensional de ADDL que tiene un intervalo de tamaños de aproximadamente un trímero o tetrámero, que tienen pesos moleculares superiores a >50 kDa.

Aunque los anticuerpos pueden tener epítopos lineales similares, dichos epítopos lineales no son completamente indicativos de las características de unión de estos anticuerpos, concretamente la capacidad de bloquear la unión de ADDL a neuronas, prevenir la fosforilación de tau e inhibir el ensamblaje de ADDL porque, como es bien conocido por el especialista en la materia, el epítipo lineal puede corresponder solo a una porción del epítipo antigénico (véase, por ejemplo, Breiting y Dübel, 1999, "Recombinant Antibodies", John Wiley & Sons, Inc., NY, pág. 115). El anticuerpo designado 19.3 de la presente invención puede distinguirse de aquellos de la materia por ser capaz de reconocer diferencialmente ADDL multidimensionales y por consiguiente bloquear diferencialmente la unión de ADDL a neuronas, prevenir diferencialmente la fosforilación de tau e inhibir diferencialmente el ensamblaje de ADDL.

Un anticuerpo, como se usa de acuerdo con la presente invención, incluye, pero sin limitación, anticuerpos policlonales o monoclonales y anticuerpos quiméricos, humanos (por ejemplo, aislados de linfocitos B), humanizados, neutralizantes, dicespecíficos o monocatenarios de los mismos. En una realización, un anticuerpo de la presente invención es monoclonal. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos hospedadores, incluyendo cabras, conejos, pollos, ratas, ratones, seres humanos y otros, mediante inyección con ADDL sintéticos o naturales. Los procedimientos para producir anticuerpos son bien conocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497; Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988.

Dependiendo de la especie hospedadora, pueden usarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Los coadyuvantes usados de acuerdo con la presente invención aumentan deseablemente la respuesta intrínseca a los ADDL sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los coadyuvantes particularmente adecuados incluyen monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (MPL™; RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT; véase el documento GB 2220211) y emulsiones de aceite en agua tales como escualeno o aceite de cacahuete, opcionalmente en combinación con inmunoestimulantes tales como monofosforil-lípido A (véase Stoute, y col., 1997, *N. Engl. J. Med.*, 336: 86-91), péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanil-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)etilamina (E-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida (DTP-DPP)) u otros componentes de pared celular bacteriana. Los ejemplos específicos de emulsiones de aceite en agua incluyen MF59 (documento WO 90/14837) que contiene 5 % de escualeno, 0,5 % de TWEEN™ 80 y 0,5 % de SPAN 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador de modelo How (Microfluidics, Newton, MA); SAF que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de TWEEN™ 80, 5 % de polímero L121 bloqueado con PLURONIC® y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometido a vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula y el sistema coadyuvante RIBI™ (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de TWEEN™ 80 y uno o más componentes de pared celular bacteriana tales como monofosforil-lípido A, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS).

Es otra clase de coadyuvantes los coadyuvantes de saponina, tales como STIMULON™ (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas a partir de la misma tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX® (CSL Ltd., Parkville, Australia). Otros coadyuvantes adecuados incluyen coadyuvante completo de Freund (CFA), coadyuvante incompleto de Freund (IFA), geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles PLURONIC®, polianiones, péptidos, CpG (documento WO 98/40100), hemocianina de lapa bocallave, dinitrofenol y citocinas tales como interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF). Entre los coadyuvantes usados en seres humanos, son particularmente adecuados BCG (bacilos de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Se genera un anticuerpo de un ADDL de conformación multidimensional inmunizando un animal con ADDL. Generalmente, los ADDL pueden generarse sintéticamente o mediante expresión y purificación de fragmento recombinante. Los ADDL sintéticos pueden prepararse como se da a conocer en la presente memoria, o de acuerdo

con los procedimientos dados a conocer en las patentes de EE.UU. nº 6.218.506 y 7.811.563, o en las solicitudes en tramitación junto con la presente U.S. 2007/0218499, U.S. 2010/0143396 y U.S. 2010/0240868. Además, los ADDL pueden estar fusionados con otra proteína tal como hemocianina de lapa bocallave para generar un anticuerpo contra la molécula quimérica. Los ADDL pueden estar conformacionalmente limitados para formar un epítipo útil como se describe en la presente memoria y pueden estar además asociados con una superficie, por ejemplo enlazados físicamente o unidos químicamente a una superficie, de tal manera que se permita la producción de una conformación que sea reconocida por los anticuerpos de la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales de conformaciones multidimensionales de ADDL pueden prepararse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estos incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos y la técnica de hibridoma de EBV (Kohler, y col., 1975, Nature 256: 495-497; Kozbor, y col., 1985, J. Immunol. Methods 81: 31-42; Cote, y col., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 2026-2030; Cole, y col., 1984, Mol. Cell Biol. 62: 109-120).

En realizaciones particulares, los anticuerpos de la presente invención están humanizados. Los anticuerpos humanizados o quiméricos pueden producirse mediante el "splicing" de genes de anticuerpo de ratón con genes de anticuerpo humano, obteniendo una molécula con la especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (véanse, Morrison, y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851-6855; Neuberger, y col., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda, y col., 1985, Nature 314:452-454; Queen, y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033; WO 90/07861). Por ejemplo, un anticuerpo de ratón se expresa como el fragmento Fv o Fab en un vector de selección de fago. El gen de la cadena ligera (y en un experimento paralelo el gen de la cadena pesada) se intercambia por una colección de genes de anticuerpo humano. Se identifican entonces los anticuerpos de fago que se siguen uniendo al antígeno. Este procedimiento, conocido comúnmente como reordenamiento de cadena, proporcionaba anticuerpos humanizados que deberían unirse al mismo epítipo que el anticuerpo de ratón del que descienden (Jespers, y col., 1994, Biotechnology NY 12: 899-903). Como alternativa, puede efectuarse el reordenamiento de cadena a nivel de proteína (véase Figini, y col., 1994, J. Mol. Biol. 239: 68-78).

Los anticuerpos humanos pueden obtenerse también usando procedimiento de presentación en fago. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 91/17271 y WO 92/01047. En estos procedimientos, se producen colecciones de fago en que los miembros presentan diferentes anticuerpos sobre sus superficies exteriores. Los anticuerpos se presentan habitualmente como fragmentos Fv o Fab. Se seleccionan los anticuerpos de presentación en fago con una especificidad deseada por enriquecimiento por afinidad con ADDL. Pueden producirse también anticuerpos humanos contra ADDL a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana y del locus de inmunoglobulina endógena inactivada. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/12227 y WO 91/10741. Los anticuerpos humanos pueden seleccionarse mediante experimentos de unión competitiva o, de otro modo, por tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular. Dichos anticuerpos retienen generalmente las propiedades funcionales útiles de los anticuerpos de ratón. Los anticuerpos policlonales humanos pueden proporcionarse también en forma de suero de seres humanos inmunizados con un agente inmunogénico. Opcionalmente, dichos anticuerpos policlonales pueden concentrarse mediante purificación por afinidad usando ADDL como reactivo de afinidad.

Como se ejemplifica en la presente memoria, pueden producirse también anticuerpos humanizados recubriendo o revistiendo anticuerpos de murino. El revestimiento implica el reemplazo de solo los aminoácidos de la región fijada a la superficie en las regiones variables de cadena pesada y ligera de ratón por aquellos de la secuencia de anticuerpo humano homóloga. Se ha mostrado que reemplazar aminoácidos de superficie de ratón por residuos humanos en la misma posición de una secuencia humana homóloga reduce la inmunogenicidad del anticuerpo de ratón, conservando su unión a ligando. El reemplazo de residuos exteriores tiene generalmente poco efecto, o ninguno, en los dominios interiores o en los contactos interdominio. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.797.492.

Los anticuerpos humanos o humanizados pueden diseñarse para tener las regiones constantes de IgG, IgD, IgA, IgM o IgE y de cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En realizaciones particulares, es un anticuerpo de la invención IgG o IgM, o una combinación de los mismos. En una realización específica, los anticuerpos de la presente invención son IgG2. Los especialistas en la materia entenderían que puedan utilizarse en la presente memoria otras isoformas. Las secuencias ejemplares de estas isoformas se dan en las SEQ ID NO: 43-45. Otras realizaciones engloban una región constante formada por la incorporación selectiva de secuencias de IgG4 humana a una región constante de IgG2 humana estándar. Es un mutante de Fc de IgG2 ejemplar IgG2m4, expuesto en la presente memoria como SEQ ID NO: 46. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas y ligeras separadas o como anticuerpos monocatenarios en que los dominios variables de cadena pesada y ligera están ligados a través de un espaciador. Son bien conocidas en la materia las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios.

Se dan a conocer anticuerpos humanizados ejemplares producidos mediante injerto de CDR y revestimiento en las patentes de EE.UU. nº 7.780.963, 7.731.962 y 7.811.563.

Se contemplan también los diacuerpos. Diacuerpo hace referencia a un constructo de anticuerpo genomanipulado preparado aislando los dominios de unión (tanto de cadena pesada como ligera) de un anticuerpo de unión y suministrando un resto ligador que une o liga operativamente las cadenas pesada y ligera en la misma cadena polipeptídica, conservando así la función de unión (véanse Holliger, y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444; Poljak, 1994, Structure 2: 1121-1123). Esto forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado que tiene solo el dominio variable necesario para unión al antígeno. Al usar un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Estos fragmentos de anticuerpo diméricos, o diacuerpos, son divalentes y diespecíficos. El especialista en la materia apreciará que puede usarse cualquier procedimiento para generar diacuerpos. Se describen procedimientos adecuados en Holliger, y col., 1993, *supra*; Poljak, 1994, *supra*; Zhu, y col., 1996, Biotechnology 14: 192-196 y en la patente de EE.UU. nº 6.492.123.

Los fragmentos de anticuerpo aislado de la invención están también englobados expresamente por la presente invención. Se pretende que los fragmentos incluyan fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(ab'), fragmentos scFv diespecíficos, fragmentos Fv y fragmentos producidos por una colección de expresión de Fab, así como aptámeros peptídicos. Por ejemplo, se producen fragmentos F(ab')₂ mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo de la invención, mientras que se generan fragmentos Fab mediante reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, pueden construirse colecciones de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y sencilla de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada (véase Huse, y col., 1989, Science, 254: 1275-1281). En realizaciones particulares, los fragmentos de anticuerpo de la presente invención son fragmentos de anticuerpos neutralizantes que retienen el sitio de unión a la región variable de los mismos, concretamente el fragmento de unión a antígeno. Son ejemplares los fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(ab') y fragmentos Fab. Véase, en general, "Immunology: Basic Processes", 1985, 2ª edición, J. Bellanti (Ed.) pág. 95-97.

Los aptámeros peptídicos que reconocen diferencialmente conformaciones multidimensionales de ADDL pueden diseñarse racionalmente o cribarse en una colección de aptámeros (por ejemplo, proporcionada por Aptanomics SA, Lyon, Francia). En general, los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento sintéticas cuyo diseño está basado en la estructura de los anticuerpos. Los aptámeros peptídicos consisten en un bucle peptídico variable enlazado en ambos extremos con un esqueleto proteico. Esta doble limitación estructural aumenta en gran medida la afinidad de unión del aptámero peptídico a niveles comparables a los de un anticuerpo (intervalo nanomolar).

Se dan a conocer secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican regiones variables de cadena pesada y ligera para uso en la producción de anticuerpo y fragmentos de anticuerpo ejemplificados en la presente memoria en las SEQ ID NO: 14 y 16. Como se apreciará por el especialista en la materia, las regiones variables de cadena pesada dadas a conocer en la presente memoria, tales como las mostradas en la SEQ ID NO: 16, pueden usarse en combinación con una cualquiera de las regiones variables de cadena ligera dadas a conocer en la presente memoria, generando anticuerpos con afinidades, disociación, epítomos y similares modificados.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dados a conocer pueden tener restos adicionales enlazados a los mismos. Por ejemplo, puede enlazarse una microesfera o micropartícula al anticuerpo o fragmento de anticuerpo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.493.825.

Además, una realización particular engloba un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo que se mutan y se seleccionan por una afinidad de antígeno o actividad neutralizante (concretamente, la capacidad de bloquear la unión de ADDL a células neuronales o la capacidad de bloquear el ensamblaje de ADDL) aumentadas o una constante de disociación modificada. Las cepas mutantes de *E. coli* (Low, y col., 1996, J. Mol. Biol., 260: 359-368), el reordenamiento de cadena (Figini, y col., 1994, *supra*) y la mutagénesis por PCR son procedimientos establecidos para mutar moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos. A modo de ilustración, puede seleccionarse la afinidad aumentada poniendo en contacto un gran número de anticuerpos de fago con una baja cantidad de antígeno biotinilado, de modo que los anticuerpos compitan por la unión. En este caso, el número de moléculas de antígeno debería superar el número de anticuerpos de fago, pero la concentración de antígeno debería ser algo menor que la constante de disociación. Por tanto, se unen predominantemente anticuerpos de fago mutados con afinidad aumentada al antígeno biotinilado, mientras que la mayor parte de los anticuerpos de fago de afinidad menor permanecen sin unir. La estreptavidina puede ayudar entonces al enriquecimiento de los anticuerpos de fago mutados de mayor afinidad de la mezcla (Schier, y col., 1996, J. Mol. Biol. 255: 28-43). Se dan a conocer en la presente memoria secuencias aminoácidas de CDR3 de cadena ligera maduras por afinidad ejemplares (véase la Tabla 4), englobando realizaciones particulares una secuencia aminoácida de CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 3 y realizaciones específicas de SEQ ID NO: 7-13. Se dan a conocer además variaciones alternativas de CDR1 (SEQ ID NO: 53) y CDR2 (SEQ ID NO: 54) de cadena ligera.

Para algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable reducir la disociación del anticuerpo del antígeno. Para conseguir esto, se unen anticuerpos de fago a antígeno biotinilado y se añade un exceso de antígeno no biotinilado. Después de un periodo de tiempo, pueden recogerse con estreptavidina predominantemente los anticuerpos de fago

con menor constante de disociación (Hawkins, y col., 1992, J. Mol. Biol. 226: 889-96).

Pueden usarse diversos inmunoensayos incluyendo aquellos dados a conocer en la presente memoria para cribado para identificar anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que tienen la especificidad deseada por conformaciones multidimensionales de ADDL. Son bien conocidos en la materia numerosos protocolos de unión competitiva (por ejemplo, ELISA), ensayos de aglutinación de látex, ensayos inmunoradiométricos, cinéticos (por ejemplo, análisis Biacore™) usando anticuerpos policlonales o monoclonales, o fragmentos de los mismos. Dichos inmunoensayos implican típicamente la medida de la formación de complejo entre un anticuerpo específico y su antígeno relacionado. Es adecuado un inmunoensayo de base monoclonal de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítomos no interferentes, pero puede emplearse también un ensayo de unión competitiva. Dichos ensayos pueden usarse también en la detección de conformaciones multidimensionales de ADDL en una muestra.

Puede someterse también un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a otros ensayos de actividad biológica, p.ej., desplazamiento de la unión de ADDL a neuronas o células hipocámpicas cultivadas o bloqueo del ensamblaje de ADDL, para evaluar la actividad neutralizante o farmacológica y la eficacia potencial como agente profiláctico o terapéutico. Dichos ensayos se describen en la presente memoria y son bien conocidos en la materia.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden producirse y mantenerse como hibridomas o, como alternativa, producirse recombinantemente en cualquier sistema de expresión bien establecido incluyendo, pero sin limitación, *E. coli*, levadura (p.ej., *Saccharomyces* spp. y *Pichia* spp.), baculovirus, células de mamífero (p.ej., mieloma, CHO, COS), plantas o animales transgénicos (Breitling y Dübel, 1999, "Recombinant Antibodies", John Wiley & Sons, Inc., NY, pág. 119-132). Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden aislarse usando cualquier procedimiento apropiado incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, moléculas de unión a inmunoglobulinas (por ejemplo, proteínas A, L, G o H), marcajes ligados operativamente al anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, marcaje His, marcaje FLAG®, marcaje Strep, marcaje c-myc) y similares. Véase Breitling y Dübel, 1999 *supra*.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención tienen una variedad de usos incluyendo el diagnóstico de enfermedades asociadas a la acumulación de ADDL, el bloqueo o inhibición de la unión de ADDL a células neuronales, el bloqueo del ensamblaje de ADDL, el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad asociada a ADDL, la identificación de agentes terapéuticos que previenen la unión de ADDL a neuronas y la prevención de la fosforilación de proteína tau en Ser202/Thr205.

El anticuerpo y fragmentos de anticuerpo de la presente invención son útiles en un procedimiento para bloquear o inhibir la unión de ADDL a células neuronales. Este procedimiento dado a conocer se lleva a cabo poniendo en contacto una neurona, *in vitro* o *in vivo*, con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención, de modo que se bloquee la unión de los ADDL a la neurona. En realizaciones particulares, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención consigue al menos un 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 97 % de descenso de la unión de ADDL en comparación con la unión de ADDL en ausencia del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El grado en que un anticuerpo puede bloquear la unión de ADDL a una neurona puede determinarse de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en la presente memoria, concretamente inmunocitoquímica o ensayos de fosfatasa alcalina basados en células, o cualquier otro ensayo adecuado. Los anticuerpos particularmente útiles para reducir la unión de ADDL a células neuronales incluyen los anticuerpos anti-ADDL ejemplares mostrados en las patentes de EE.UU. nº 7.731.962, 7.780.963 y 7.811.563, así como derivados y fragmentos de los mismos.

El anticuerpo y fragmentos de anticuerpo de la presente invención son además útiles en un procedimiento para bloquear o inhibir el ensamblaje de ADDL. Este procedimiento implica poner en contacto una muestra que contiene péptidos amiloide β 1-42 con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención, de modo que se inhiba el ensamblaje de ADDL. El grado en que un anticuerpo puede bloquear el ensamblaje de ADDL puede determinarse de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en la presente memoria, concretamente FRET o polarización de fluorescencia o cualquier otro ensayo adecuado. Los anticuerpos particularmente útiles para bloquear el ensamblaje de los ADDL incluyen anticuerpos anti-ADDL que tienen una secuencia aminoacídica de CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 10, así como derivados y fragmentos de la misma.

Los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria son también útiles en procedimientos para prevenir la fosforilación de proteína tau en Ser202/Thr205. Este procedimiento implica poner en contacto una muestra que contiene proteína tau con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención, de modo que se bloquee la unión de ADDL a neuronas, previniendo así la fosforilación de la proteína tau. El grado en que un anticuerpo puede prevenir la fosforilación de la proteína tau en Ser202/Thr205 puede determinarse de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en la presente memoria o cualquier otro ensayo adecuado.

El bloqueo o descenso de la unión de ADDL a neuronas, la inhibición del ensamblaje de ADDL y la prevención de la

fosforilación de proteína tau en Ser202/Thr205 encuentran todos aplicación en procedimiento de tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL. Por consiguiente, la presente invención engloba también el uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente memoria para prevenir o tratar una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o trastornos similares relacionados con la memoria). Las evidencias en la técnica indican que los niveles elevados de A β , pero no necesariamente la placa agregada, causan demencia asociada a enfermedad de Alzheimer y posteriores anomalías de tau. Los ligandos difusibles derivados de A β están directamente implicados en la neurotoxicidad asociada a la enfermedad de Alzheimer. La técnica indica que los ADDL son elevados en ratones transgénicos y pacientes con enfermedad de Alzheimer y que modulan la actividad funcional asociada a procesos mnemónicos en modelos animales. Por tanto, retirar esta forma de A β podría proporcionar alivio de la neurotoxicidad asociada a la enfermedad de Alzheimer. Como tal, el tratamiento con un anticuerpo de la presente invención que reduce la carga de ADDL en el sistema nervioso central podría probarse eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos con riesgo de enfermedad pero que no exhiben síntomas, así como pacientes que exhiben actualmente síntomas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, virtualmente todo el mundo está en riesgo de o padece la enfermedad de Alzheimer si vive lo suficiente. Por lo tanto, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden administrarse profilácticamente a la población general sin necesidad de valoración del riesgo del paciente sujeto. Los presentes procedimientos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen aquellos que tienen parientes que se han diagnosticado con la enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina mediante el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos del riesgo de enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 a las que se hace referencia respectivamente como las mutaciones de Hardy y Swedish. Son otros marcadores de riesgo las mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, un historial familiar de enfermedad de Alzheimer, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que padecen actualmente enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por una demencia característica, así como por la presencia de los factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles una serie de pruebas de diagnóstico para identificar a individuos que tienen la enfermedad de Alzheimer. Estas incluyen la medida de los niveles de tau y A β 1-42 en LCR. Los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer pueden diagnosticarse también mediante los criterios de la ADRDA o el procedimiento dado a conocer en la presente memoria.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20 o 30 años). Habitualmente, sin embargo, no es necesario empezar el tratamiento hasta que el paciente alcanza los 40, 50, 60 o 70 años. El tratamiento conlleva típicamente múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse ensayando la presencia de ADDL con el tiempo.

En aplicaciones terapéuticas, se administra una composición farmacéutica o medicamento que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención a un paciente sospechoso de, o que padece ya, dicha enfermedad asociada a la acumulación de ADDL en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones profilácticas, se administra una composición farmacéutica o medicamento que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención a un paciente susceptible de, o de otro modo en riesgo de, una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL en una cantidad suficiente para conseguir la inmunidad pasiva en el paciente, eliminando o reduciendo así el riesgo, reduciendo la gravedad o retardando el inicio de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la enfermedad. En algunos procedimientos, la administración de agente reduce o elimina la alteración miocognitiva en pacientes que no han desarrollado todavía la patología de Alzheimer característica. En realizaciones particulares, es una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención una cantidad que consigue al menos un 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 97 % de descenso de la unión de ADDL a neuronas en el paciente, en comparación con la unión de ADDL en ausencia de tratamiento. Como tal, desciende la alteración de la potenciación a largo plazo/formación de la memoria.

Las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero pueden tratarse también mamíferos no humanos tales como perros o animales transgénicos.

Las dosificaciones de tratamiento se titulan generalmente para optimizar la seguridad y eficacia. Para inmunización pasiva con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, son adecuados intervalos de dosificación de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o estar dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. En algunos procedimientos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos de la invención con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado entra dentro

de los intervalos indicados. Los anticuerpos se administran habitualmente en múltiples ocasiones, donde los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Un régimen de tratamiento ejemplar conlleva la dosificación subcutánea una vez cada dos semanas o al mes. Los intervalos pueden ser también irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo de ADDL en el paciente. En algunos procedimientos, se ajusta la dosificación para conseguir una concentración plasmática de anticuerpo de 1-1000 µg/ml y, en algunos procedimientos, de 25-300 µg/ml. Como alternativa, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede administrarse en forma de una formulación de liberación prolongada, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos y humanizados tienen semividas más largas que los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. Como se indica anteriormente, la dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere a veces una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta reducir o terminar con la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

El anticuerpo y fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden administrarse como un componente de una composición farmacéutica o medicamento. Las composiciones farmacéuticas o medicamentos contienen generalmente el agente terapéutico activo y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington: "The Science and Practice of Pharmacy", Alfonso R. Gennaro, editor, 20ª ed. Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2000. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica pretendidos. Las composiciones farmacéuticas pueden contener, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos usados comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. Los diluyentes se seleccionan para no afectar a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de dichos diluyentes agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener también macromoléculas grandes metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como SEPHAROSE™ funcionalizado con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros aminoácidos y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas).

La administración de una composición farmacéutica o medicamento de la invención puede llevarse a cabo por una variedad de vías incluyendo, pero sin limitación, oral, tópica, pulmonar, rectal, subcutánea, intradérmica, intranasal, intracraneal, intramuscular, intraocular o inyección intratecal o intraarticular y similares. La vía de administración más típica es la intravenosa seguida de subcutánea, aunque otras vías pueden ser igualmente efectivas. Puede efectuarse también una inyección intramuscular en los músculos del brazo o la pierna. En algunos procedimientos, se inyectan los agentes directamente a un tejido particular donde se han acumulado los depósitos, por ejemplo inyección intracraneal o intratecal. En algunas realizaciones, se inyecta directamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo en el cráneo o LCR. En otras realizaciones, se administra el anticuerpo o fragmento de anticuerpo en forma de una composición o dispositivo de liberación prolongada tal como un dispositivo MEDIPAD™.

Para administración parenteral, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponadoras del pH y similares. Son otros componentes de composiciones farmacéuticas aquellos con origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos adecuados, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una preparación de inyección o implante de efecto prolongado que puede formularse de tal manera que permita una liberación prolongada del ingrediente activo.

Una composición ejemplar contiene un anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo del mismo, de la presente invención formulado en forma de un líquido estéril transparente a una concentración de al menos 10 mg/ml en solución salina tamponada isotónica (histidina 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, POLYSORBATE 80 al 0,01% (p/v), pH 6,0). Se rellena una formulación de anticuerpo ejemplar como una dosis única, de viales de vidrio de 0,6 ml rellenos con 3,3 ml de solución por vial. Se tapa cada vial con un tapón recubierto de TEFLON y se sella con una tapa de aluminio.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación puede emulsionarse también o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como

polilactida, poliglicolida o copolímero para suministro mejorado.

Para supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5 a 10 %, o más deseablemente de 1-2 %.

Las formulaciones orales incluyen excipientes tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa y carbonato de magnesio de pureza farmacéutica. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación prolongada o polvos y contienen 10-95 % de ingrediente activo, o más adecuadamente 25-70 %.

La aplicación tópica puede dar como resultado un suministro transdérmico o intradérmico. La administración tópica puede facilitarse por la coadministración del agente con toxina del cólera o derivados detoxificados o subunidades de la misma u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn, y col. (1998) Nature 391: 851). Puede conseguirse la coadministración usando los componentes como una mezcla o como moléculas ligadas obtenidas mediante reticulación química o expresión como proteína de fusión.

Como alternativa, puede conseguirse el suministro transdérmico usando un parche dérmico o usando transferosomas (Paul, y col., 1995, Eur. J. Immunol. 25: 3521-3524; Cevc, y col., 1998, Biochem. Biophys. Acta 1368: 201-215).

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente efectivos en el tratamiento de enfermedad amiloidogénica. Por ejemplo, el presente anticuerpo puede administrarse con tratamientos paliativos existentes para la enfermedad de Alzheimer, tales como los inhibidores de acetilcolinesterasa tales como ARICEPT™, EXELON™ y REMINYL™ y el antagonista de NMDA NAMENDA™. Además de estos tratamientos aprobados, el presente anticuerpo puede usarse para proporcionar beneficios sinérgicos/aditivos para cualquiera de los varios enfoques actualmente en desarrollo para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que incluyen, sin limitación, inhibidores de la producción y agregación de Aβ.

El anticuerpo y fragmentos de anticuerpo de la presente invención encuentran aplicación también en la identificación de agentes terapéuticos que previenen la unión de ADDL a neuronas (p.ej., una célula hipocámpica), previniendo así los eventos posteriores atribuidos a los ADDL. Dicho ensayo se lleva a cabo poniendo en contacto una neurona con ADDL en presencia de un agente y usando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención para determinar la unión de los ADDL a la neurona en presencia del agente. Como se apreciará por un especialista en la materia, un agente que bloquee la unión de ADDL a una neurona reducirá la cantidad de ADDL unidos a la neurona en comparación con una neurona que no se haya puesto en contacto con el agente en una cantidad que es detectable en un inmunoensayo que emplea un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención. Se dan a conocer en la presente memoria inmunoensayos adecuados para detectar ADDL unidos a neuronas.

Los agentes que pueden cribarse usando el procedimiento proporcionado en la presente memoria engloban numerosas clases químicas, aunque son típicamente moléculas orgánicas, preferiblemente moléculas orgánicas pequeñas que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2.500 Da. Los agentes engloban grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, e incluyen típicamente al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes contienen a menudo estructuras carbocíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes pueden encontrarse también entre las biomoléculas, incluyendo péptidos, anticuerpos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Los agentes se obtienen a partir de una amplia variedad de fuentes, incluyendo colecciones de compuestos naturales o sintéticos.

Pueden incluirse una variedad de otros reactivos tales como sales y proteínas neutras en los ensayos de cribado. Pueden usarse también reactivos que mejoren de otro modo la eficiencia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos y similares. La mezcla de componentes puede añadirse en cualquier orden que proporcione la unión necesaria.

Los agentes identificados por el ensayo de cribado de la presente invención serán beneficiosos para el tratamiento de enfermedades amiloidogénicas y/o tauopatías. Además, se contempla que los sistemas experimentales usados para ejemplificar estos conceptos representan herramientas de investigación para la evaluación, identificación y cribado de dianas farmacológicas novedosas asociadas a la inducción de amiloide beta o la fosforilación de tau.

La presente invención proporciona también procedimientos para detectar ADDL y diagnosticar una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL usando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente memoria. Una

enfermedad asociada a la acumulación de ADDL pretende incluir cualquier enfermedad donde la acumulación de ADDL dé como resultado la alteración fisiológica de la potenciación a largo plazo/formación de la memoria. Las enfermedades de este tipo incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados con la memoria similares.

De acuerdo con estos procedimientos, se pone en contacto una muestra de un paciente con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la muestra es indicativa de la presencia de ADDL en la muestra. Como se usa en el contexto de la presente invención, se pretende que muestra signifique cualquier fluido o tejido corporal que sea susceptible de análisis usando inmunoensayos. Las muestras adecuadas que pueden analizarse de acuerdo con los procedimientos de la invención incluyen, pero sin limitación, muestras de biopsia y muestras de fluido del cerebro de un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Con fines *in vitro* (por ejemplo, en ensayos que monitorizan la formación de oligómeros), una muestra puede ser una línea celular neuronal o muestra de tejido. Con fines de diagnóstico, se contempla que la muestra pueda ser de un individuo sospechoso de tener una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL o de un individuo con riesgo de tener una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL, por ejemplo un individuo con un historial familiar que predispone al individuo a una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL.

La detección de la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a ADDL en la muestra puede llevarse a cabo usando cualquier inmunoensayo estándar (por ejemplo, como se da a conocer en la presente memoria) o, como alternativa cuando el fragmento de anticuerpo es, por ejemplo, un aptámero peptídico, la unión puede detectarse directamente, por ejemplo, por una proteína marcadora detectable (por ejemplo, β -galactosidasa, GFP o luciferasa) fusionada con el aptámero. Posteriormente, se correlaciona la presencia o ausencia del complejo ADDL-anticuerpo con la presencia o ausencia, respectivamente, de ADDL en la muestra y por lo tanto la presencia o ausencia, respectivamente, de una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL. Se contempla que pueden usarse uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención junto con técnicas de imagenología de base inmunitaria no invasivas actuales para mejorar en gran medida la detección y diagnóstico temprano de una enfermedad asociada a la acumulación de ADDL.

Para facilitar el diagnóstico, la presente invención se refiere también a un kit que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente memoria. El kit incluye un envase que contiene uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que reconocen una conformación multidimensional de ADDL e instrucciones para uso del anticuerpo con fines de unión a ADDL, formando un complejo de anticuerpo-antígeno y detectando la formación del complejo de anticuerpo-antígeno de tal modo que la presencia o ausencia de complejo de anticuerpo-antígeno se correlacione con la presencia o ausencia de ADDL en la muestra. Los ejemplos de envases incluyen placas multipocillo que permiten la detección simultánea de ADDL en múltiples muestras.

EJEMPLOS

Se usan las siguientes abreviaturas en la presente memoria: Ac: anticuerpo; A β : proteína beta amiloide; EA: enfermedad de Alzheimer; ADDL: ligando difusible derivado de amiloide β (A β); Ag: antígeno; APP: proteína precursora de amiloide; bADDL: ADDL biotinilados; LCR: líquido ceforraquídeo; DMSO: dimetilsulfóxido; hAPP: proteína precursora de amiloide humana; medio HAT: medio de hipoxantina-aminopterina-timidina; HFIP: hexafluoro-2-propanol; IV: intravenoso; agar LB: agar de caldo de lisogenia; SC: subcutáneo; PBS: solución salina tamponada con fosfato; TEA: trietilamina.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos generales

A. Generación de anticuerpos monoclonales de ADDL

Se mezclaron 1:1 oligómeros de A β solubles, una especie a la que se hace referencia en la presente memoria como ADDL "sintéticos", con coadyuvante completo de Freund (primera y segunda vacunaciones) o coadyuvante incompleto de Freund (todas las vacunaciones posteriores) y se procuraron por inyección subcutánea (dos primeras vacunaciones) o intraperitoneal a 3 ratones a un volumen total de 1 ml/ratón. Cada inyección consistía en ADDL purificados equivalentes a 194 ± 25 μ g de proteína total. Se inyectaron los ratones aproximadamente cada 3 semanas. Después de 6 inyecciones, un ratón murió y se congeló su bazo. Se fusionó entonces el bazo del ratón con el suero de título mayor con las células de mieloma SP2/0 en presencia de polietilenglicol y se sembraron en 6 placas de 96 pocillos. Se cultivaron las células a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 10 días en 200 μ l de medio de selección de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), que está compuesto por un medio sintético enriquecido tal como medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), HYBRI-MAX® (azaserina-hipoxantina; Sigma-Aldrich, MO) 1 μ g/ml y 30 % de medio acondicionado recogido del cultivo celular de SP2/0. Se alimentaron los cultivos una vez con IMDM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con 10 % de FBS el día 10 y se retiraron los sobrenadantes de cultivo el día 14 para

cribar los pocillos positivos por ELISA. Se clonaron adicionalmente los cultivos positivos por diluciones limitantes con una probabilidad de 0,3 células por pocillo. Se confirmaron los clones positivos por ELISA y se expandieron adicionalmente. Se produjeron entonces anticuerpos monoclonales y se purificaron para uso (QED Bioscience, San Diego, CA).

5

B. Preparación de ADDL y bADDL

Se prepararon ADDL usando los procedimientos anteriormente descritos (Hepler, y col., 2006, *Biochemistry*. 45: 15157-15167; Shughrue, y col., 2010, *Neurobiol. Aging*, 31: 189-202). Brevemente, se disolvió péptido A β 1-42 sintético (American Peptide, Sunnyvale, CA) en hexafluoro-2-propanol (HFIP) a una concentración de 10 mg/ml y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora. Se dispensó la solución peptídica en alícuotas de 50 μ l en tubos de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml. Se retiró el HFIP usando un SpeedVac® (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA) y se almacenaron las películas peptídicas resultantes desecadas a -70 °C hasta necesitarlas. Se disolvió una película de HFIP secada de 0,5 mg en 22 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro con agitación durante 10 minutos en un mezclador con vórtex. Posteriormente, se añadió rápidamente 1 ml de medio F12 de Ham frío sin rojo fenol (United Biosource, San Francisco, CA) a la mezcla de DMSO/péptido. Se tapó el tubo, se invirtió para asegurar un mezclado completo y se incubó durante una noche a 4 °C. La mañana siguiente, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 12.000 x g en una microcentrífuga Beckman (Beckman Coulter, Brea, CA) que funciona a 2-8 °C. Se recogió el sobrenadante y se filtró a través de un filtro centrífugo de ym 50 (corte molecular de 50.000 kDa) Ceniricon® (Millipore, Billerica, MA) para enriquecer las especies oligoméricas. Se prepararon ADDL biotinilados (bADDL) usando los mismos procedimientos, pero partiendo de péptido A β 1-42 biotinilado N-terminal (American Peptide, Sunnyvale, CA).

10

15

20

25

C. Preparaciones monoméricas y fibrilares

Para generar preparaciones monoméricas, se disolvió película del péptido RT A β 1-40 o A β 1-42 en 2 ml de tampón borato 25 mM (pH 8,5) por mg de péptido, se dividió en alícuotas y se congeló a -70 °C hasta el uso. Se elaboraron las preparaciones fibrilares añadiendo 2 ml de ácido clorhídrico 10 mM por mg de película de péptido A β 1-42. Se mezcló la solución en un mezclador con vórtex a la velocidad menor posible durante 5 a 10 minutos, y se almacenó la preparación resultante a 37 °C durante 18 a 24 horas antes del uso.

30

D. Neuronas primarias

Se prepararon cultivos neuronales primarios a partir de tejidos hipocámpicos y/o corticales de rata adquiridos en BrainBits (Springfield, IL). Después de la disociación, se sembraron las células a 35.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos prerrecubiertas con laminina y poli-D-lisina (Corning Life Sciences, Lowell, MA). Se mantuvieron las células a 37 °C con 5 % de CO₂ en medio (neurobasal suplementado con 2 % de B27, 1 % de L-glutamina y 1 % de pen/estrep; Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 2-3 semanas y se usaron entonces para estudios de unión.

40

E. Ensayo de unión de ADDL basado en células

Para medir el efecto de los anticuerpos anti-ADDL sobre el bloqueo de la unión de ADDL, se mezclaron anticuerpos anti-ADDL con bADDL 500 nM, con las concentraciones de anticuerpo final oscilando de 1,8 nM a 450 nM. Como control, se mezcló la misma concentración de anticuerpo desnaturalizado térmicamente (98 °C durante 30 minutos) con bADDL. Se incubaron las mezclas de anticuerpo-bADDL en tubos de microcentrífuga silicizados (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) a 37 °C durante 1 hora con rotación con inversión constante a baja velocidad. Se aplicaron entonces las mezclas a cultivos hipocámpicos y/o corticales primarios y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se terminó la incubación retirando el medio de cultivo. Se sometieron las células a tratamientos de fijación y postfijación como se describe anteriormente. Se incubaron entonces las células con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) a 4 °C durante una noche, se lavaron 5 veces con PBS y se hicieron reaccionar con el sustrato quimioluminiscente Tropix® CDP®-Star (Life Technologies™, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la intensidad de unión a bADDL y se registró con un lector de microplacas EnVision® (PerkinElmer, Waltham, MA).

50

55

F. ELISA

Se añadieron ADDL biotinilados (bADDL) o A β 1-40 o A β -42 monomérico a una placa recubierta con estreptavidina de alta capacidad (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con 100 μ l por pocillo de reactivo de recubrimiento en PBS 1 μ M y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS con 0,05 % de Tween (6 veces) y después PBS solo (3 veces) antes de bloquear los pocillos con leche desnatada desecada al 5 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron entonces los pocillos, se añadió una dilución en serie de muestras de anticuerpo a las placas y se dejaron unir durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación y lavado, se detectó la unión de anticuerpo con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG-Fc humano

60

conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:1.000; 1 hora a temperatura ambiente). Se visualizó la etiqueta de HRP con tetrametilbencidina (Virolabs, Chantilly, VA) como sustrato y se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

5 **Ejemplo 2**

Selección de anticuerpos anti-ADDL

A. Selección por afinidad (Panning) de una colección de anticuerpos humanizados

10 Se construyó una colección madurada por afinidad de un anticuerpo anti-ADDL humanizado, h3B3, (véanse los documentos U.S. 2006/0228349 y U.S. 2008/0175835) en que se sometieron parte de las secuencias aminoacídicas de CDR3 de cadena ligera a mutagénesis aleatoria. Para cubrir la región CDR3 entera, se construyeron dos subcolecciones. Una colección estaba compuesta por la región variable de cadena pesada original y aminoácidos mutados en la mitad izquierda de la CDR3 de cadena ligera y la otra en la mitad derecha de la CDR3 de cadena ligera. Se usó una estrategia similar para la mutagénesis aleatoria de CDR de cadena pesada con tres subcolecciones.

20 Se sometió 3B3 humanizado (h3B3) a maduración por afinidad usando procedimientos conocidos en la materia. Se clonaron las regiones variables de h3B3 en un vector de presentación de Fab (pFab3D). En este vector, se insertaron en fase las regiones variables de cadenas pesada y ligera para coincidir con el dominio CH1 de la región constante y la región constante kappa, respectivamente. En Fab3D, el epítipo myc y 6 aminoácidos de histidina consecutivos siguen a la secuencia de CH1, que se liga entonces a la proteína pIII de fago para presentación. Se mutagenizaron aleatoriamente todas las posiciones en las CDR3 de cadena pesada y ligera usando secuencias oligonucleotídicas degeneradas construidas con los cebadores de PCR. Para acomodarse al tamaño físico, se construyeron subcolecciones, enfocándose cada una en 5-6 aminoácidos. Se usó ADN de vector de 3B3 humano (H3B3) como ADN de molde para amplificar tanto la cadena pesada como ligera con los cebadores de PCR mutados (Tabla 1). Después de la amplificación por PCR, se desarrollaron los fragmentos de ADN sintetizados en un gel de agarosa al 1,3 %, se retiraron los cebadores y se digirieron los fragmentos variables con las enzimas de restricción: 25 30 los sitios de clonación BsiWI y XbaI para la clonación de variable de cadena ligera, y XhoI y ApaI para la clonación de variable de cadena pesada.

Tabla 1

Colección de maduración por afinidad de 3B3	Cebador de PCR de codificación	Cebadores de PCR inversos
Colecciones de la cadena ligera	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 24
Colecciones de la cadena pesada	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26 SEQ ID NO: 27

35 Para construir una colección de maduración por afinidad en el vector de presentación en fago pFab3D, se digirió ADN de pFab3D-3B3 con el mismo par de enzimas de restricción, se purificó y se ligaron los fragmentos de PCR para variables de cadena pesada o ligera con ligasa T4 (Invitrogen) durante una noche a 16 °C. Se transfectaron entonces los productos de ligamiento en células TG1 de *E. coli* competentes de electroporación (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y se sembraron alícuotas del cultivo bacteriano en placas LB de agar-carbenicilina (50 µg/ml) para titular el tamaño de la colección. Se sembraron los cultivos restantes en una placa grande con carbenicilina y se incubaron a 30 °C durante una noche para la solución madre de colección de *E. coli*, o se infectaron con el fago auxiliar M13K07 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 10¹¹ ufp/ml) mediante incubación a temperatura ambiente y a 37 °C durante 10 minutos. Se añadió entonces medio 2YT con carbenicilina (50 µg/ml) y se incubó a 45 37 °C durante 1 hora con agitación. Se añadió entonces kanamicina (70 µg/ml) y se hicieron crecer los cultivos durante una noche a 30 °C con agitación. Se tituló el sobrenadante de cultivo de fago y se concentró por precipitación con PEG (polietilenglicol) al 20 % (v/v)/NaCl, se resuspendió en PBS, se esterilizó con un filtro de 0,22 µm y se tomaron alícuotas para la selección por afinidad de la colección de fago.

50 Se realizó entonces la selección por afinidad de la colección de fago como se resume en la Tabla 2.

Tabla 2

Rondas de selección por afinidad	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3	Ronda 4
Concentración de antígeno	180 nM	60 nM	20 nM	10 nM

55 Se bloquearon los fagos de entrada de las colecciones de presentación de Fab en fago (100 µl, aproximadamente 10¹¹-10¹² ufp) con 900 µl de solución de bloqueo (leche desnatada desecada al 3 % en PBS) para reducir la unión no

específica a la superficie del fago. Se prepararon perlas recubiertas de estreptavidina recogiendo 200 µl de la suspensión de perlas en un separador magnético y retirando los sobrenadantes. Se suspendieron entonces las perlas en 1 ml de solución de bloqueo y se pusieron en un mezclador rotativo durante 30 minutos. Para retirar el fago de unión no específica a estreptavidina, se mezcló la colección de fago bloqueado con perlas recubiertas con estreptavidina bloqueadas y se dispuso en un mezclador rotativo durante 30 minutos. Se transfirieron las suspensiones de fago del proceso de desección a un tubo nuevo, se añadieron 200 µl de antígeno, bADDL al 10 % y se incubó durante 2 horas para la unión de anticuerpo y antígeno. Después de la incubación, se añadió la mezcla a las perlas recubiertas de estreptavidina bloqueadas y se incubó en un mezclador rotativo durante 1 hora para capturar el complejo de Ac/Ag en las perlas de estreptavidina. Se lavaron las perlas con complejos de bADDL al 10%/fago capturados 5 veces con PBS/0,05 % de Tween y después 20 veces con PBS solo. Se eluyeron los fagos unidos de los bADDL con 200 µl de TEA 100 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y se incubaron durante 20 minutos. Se transfirieron entonces los fagos eluidos a un tubo de 50 ml, se neutralizaron con 100 µl de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 y se añadieron a 10 ml de células TG1 de *E. coli* con una DO600 nm entre 0,6-0,8. Después de la incubación a 37 °C con agitación durante 1 hora, se sembraron alícuotas de cultivo en placas LB de agar-carbenicilina (50 µg/ml) para titular el número de fagos de salida, se centrifugaron las bacterias restantes y se suspendieron con 500 µl de medio 2xYT (Teknova, Hollister, CA, sembrado en placas de agar YT de bioensayo (Teknova, Hollister, CA) que contienen 100 µg/ml de ampicilina y 1 % de glucosa. Se hicieron crecer las placas de bioensayo durante una noche a 30 °C.

Después de cada ronda de selección por afinidad, se recolectaron colonias individuales aleatoriamente para producir fagos en placas de 96 pocillos. Los procedimientos para la preparación de fago en placa de 96 pocillos eran similares a los descritos anteriormente, excepto porque no se usó una etapa de precipitación de fago. Se incubaron placas de cultivo que contienen colonias que crecen en 120 µl de medio 2xTY con ampicilina 100 µg/ml y 0,1 % de glucosa durante una noche en un agitador HiGro® (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI) a 30 °C con agitación a 450 rpm. Se usaron directamente los sobrenadantes de fago (aproximadamente 100 µl) para análisis en el ELISA de unión a ADDL descrito anteriormente. Es una diferencia que se detectó la unión de fago a ADDL con un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Waukesha, WI).

Ejemplo 3

30 Identificación de anticuerpos anti-ADDL

A partir de un intento de maduración por afinidad de cadena ligera, un panel de 7 clones mostró fuertes actividades de unión a ADDL en comparación con h3B3 en un ELISA de fago/Fab (datos no mostrados). Se seleccionaron los 7 clones para conversión en IgG y se produjeron y purificaron los anticuerpos monoclonales para caracterización adicional.

A. Selección de anticuerpo anti-ADDL

Después de la selección por afinidad y cribado de la colección descritos en el Ejemplo 2, se seleccionaron 7 clones de Fab principales (Tablas 3-5) para conversión en IgG. La Tabla 3 muestra la similitud aminoacídica para los clones seleccionados a partir de la colección de maduración por afinidad de cadena ligera respecto al anticuerpo original, h3B3. La Tabla 4A resume el número de diferencias aminoacídicas en la CDR3 de la cadena ligera de los clones seleccionados a partir de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo original, h3B3. La Tabla 4B resume el número de diferencias aminoacídicas en la CDR1 de la cadena ligera de los clones seleccionados de la CDR3 de la cadena ligera para el anticuerpo original, 19.3. La Tabla 4C resume el número de diferencias aminoacídicas en la CDR2 de la cadena ligera de los clones seleccionados de CDR3 de la cadena ligera para el anticuerpo original, 19.3. La Tabla 5 es un alineamiento de una porción (posiciones 21-117) de las regiones variables de cadena ligera para los clones seleccionados y el anticuerpo original, h3B3. La CDR3 de cada clon se muestra en negrita.

ES 2 573 135 T3

Tabla 3

Anticuerpo	11,4	17,1	14,2	13,1	19,3	7,2	9,2	h3B3 de CL humanizada
11,4		98	98	96	96	96	97	97
17,1			98	96	97	96	97	97
14,2				96	97	98	98	98
13,1					97	97	97	96
19,3						96	97	96
7,2							98	97
9,2								97

5

Tabla 4A

Anticuerpo	secuencias de CDR3 de CL	Número de diferencias aminoacídicas con h3B3
h3B3 (original)	FQGSHVPPT (SEQ ID NO: 28)	0
19,3	FQGSRLGPS (SEQ ID NO: 10)	4
17,1	FQGSRVPAS (SEQ ID NO: 7)	3
14,2	FQGSRVPPG (SEQ ID NO: 8)	2
13,1	FQGSKAHPs (SEQ ID NO: 9)	4
7,2	FQGSYAPPg (SEQ ID NO: 11)	3
9,2	FQGSRAPPF (SEQ ID NO: 12)	3
11,4	FQGSRVpVR (SEQ ID NO: 13)	3

10

Tabla 4B

Anticuerpo	secuencias de CDR1 de CL	Número de diferencias aminoacídicas con 19.3 (original)
19,3 (original)	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 1)	0
19,3 N33S	RSSQSIVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 55)	1
19,3 N33T	RSSQSIVHSTGNTYLE (SEQ ID NO: 56)	1
19,3 N33A	RSSQSIVHSAGNTYLE (SEQ ID NO: 57)	1
19,3 N33E	RSSQSIVHSEGNTYLE (SEQ ID NO: 67)	1
19,3 N33D	RSSQSIVHSDGNTYLE (SEQ ID NO: 68)	1
19,3 N33S-N35Q	RSSQSIVHSSGQTYLE (SEQ ID NO: 59)	2
19,3 N33S-N35S	RSSQSIVHSSGSTYLE (SEQ ID NO: 60)	2
19,3 N33S-N35T	RSSQSIVHSSGTTYLE (SEQ ID NO: 61)	2
19,3 N33S-N35A	RSSQSIVHSSGATYLE (SEQ ID NO: 62)	2

Tabla 4C

Anticuerpo	secuencias de CDR2 de CL	Número de diferencias aminoacídicas con 19.3 (original)
19,3 (original)	KASNRFS (SEQ ID NO: 2)	0
19,3 N58Q	KASQRFS (SEQ ID NO: 63)	1
19,3 N58S	KASSRFS (SEQ ID NO: 64)	1
19,3 N58T	KASARFS (SEQ ID NO: 65)	1
19,3 N58A	KASARFS (SEQ ID NO: 66)	1

5

Tabla 5

17.5

PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVI
AEDVGVYYCFQGSRV**P**ASFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 33)

10

14.2

PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVI
AEDVGVYYCFQGSRV**PP**GFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 34)

15

13.1

PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVI
AEDVGVYYCFQGS**KA**HPSFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 35)

20

19.3

PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVI
AEDVGVYYCFQGS**RLG**PSFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 36)

25

7.2

PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVI
AEDVGVYYCFQGS**YAP**PFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 37)

30

9.2

PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVI
AEDVGVYYCFQGS**RAPP**FFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 38)

35

11.4

PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVI
AEDVGVYYCFQGS**RVPR**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 39)

h3B3

PASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVI
AEDVGVYYCFQGS**HVP**PTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 40)

B. Conversión en IgG

Las IgG convertidas pueden expresarse usando vectores basados en plásmido. Se construyeron los vectores de expresión de tal modo que contuvieran todos los componentes necesarios excepto las regiones variables. En los
 5 vectores básicos, se impulsó la expresión de ambas cadenas ligera y pesada por el promotor de CMV humano y la señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina. Para los 7 clones seleccionados para conversión en IgG, la región variable de cadena pesada estaba fusionada en fase con una región constante de cadena pesada de IgG2 humana (SEQ ID NO: 20 y 21), mientras que la región variable de cadena ligera estaba fusionada en fase con la región constante de cadena ligera kappa (SEQ ID NO: 18 y 19). Las secuencias principales de cadena pesada
 10 (SEQ ID NO: 29 y 30) y ligera (SEQ ID NO: 31 y 32), que median la secreción de los anticuerpos al medio de cultivo, estaban también fusionadas en fase con las regiones variables consiguientemente. Para los vectores de expresión de cadena pesada, la región constante puede seleccionarse de un isotipo de subclase diferente, p.ej. IgG1 o IgG2. Entre la secuencia principal y la región constante, las secuencias intergénicas contienen secuencias de clonación para fusión en fase continua de la región variable de entrada con la secuencia principal en su extremo 5' y la región constante en su extremo 3' usando la estrategia de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). Se usaron
 15 los kits de clonación por PCR In-Fusion™ Dry-Down (Clontech, Mountain View, CA) para amplificación por PCR de las regiones variables. El kit de clonación Dry-Down contiene todos los componentes necesarios para la reacción de PCR. Se añadieron los cebadores de PCR y ADN molde. Los vectores de expresión portan oriP del genoma vírico de EBV. El par oriP/EBNA1 se usa a menudo para prolongar la presencia del vector de expresión dentro de las células transfectadas; y se usan ampliamente para la extensión de la duración de la expresión (Lindner, y col., 2007, Plasmid 58: 1-12), para una expresión prolongada en células 293EBNA, las secuencias bacterianas de un marcador de selección de kanamicina y un origen de replicación en *E. coli*. Cuando se insertaron las regiones variables, se expresaron directamente las IgG en células de mamífero. Se clonaron todas las regiones variables de cadena pesada de la presente memoria en un vector de expresión de IgG1 (pV1JNSA-BF-HCG1) y se clonaron las regiones variables de cadena ligera en un vector de expresión kappa o lambda coincidente (pV1JNSA-GS-FB-LCK).
 25

C. Clonación de anticuerpo

El procedimiento de clonación para los vectores de expresión de anticuerpo resultantes era como sigue. Se
 30 amplificaron por PCR las regiones variables, en que se llevaron a cabo las reacciones de PCR en un volumen de 25 µl que contiene mezcla maestra de PCR de alta fidelidad, un volumen de molde de 1 µl y cebadores de codificación e inverso: 1 µl cada uno. Condiciones de PCR: 1 ciclo a 94 °C, 2 minutos; 25 ciclos a 94 °C, 1,5 minutos; 60 °C, 1,5 minutos; 72 °C, 1,5 minutos y 72 °C, 7 minutos; 4 °C hasta retirada. Se digirieron entonces los productos de PCR con DpnI y se purificaron con el kit de placa QIAquick (Qiagen, Venlo, Holanda). Se reasociaron 100 ng de los correspondientes vectores de cadena pesada o cadena ligera anteriormente linealizados con 10 ng del fragmento de PCR con una reacción In-Fusion (kit de clonación IN-Fusion Dry-Down, Clontech, Mountain View, CA). Se transformó la mezcla de reacción en células competentes XL2 Blue MRF' y se sembraron durante una noche en placas de agar que contenían kanamicina 50 µg/ml. Se digirieron los constructos de cadena ligera con HindIII + NotI y se digirieron los constructos de cadena pesada con AspI + HindIII, para comprobar la estructura por análisis de restricción. Se confirmaron las secuencias de ADN de todos los clones mediante secuenciación.
 40

D. Expresión de anticuerpo en células de mamífero y purificación

La secuenciación confirmó que los constructos de ADN de cadena ligera y cadena pesada se transfectaban en
 45 células 293 Freestyle (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se transfectaron las células 293 Freestyle usando transfectina 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se transfectaron células de monocapa de EBNA usando reactivos de transfección basados en PEI. Se incubaron las células transfectadas a 37 °C/5 % de CO₂ durante 7 días en medio exento de suero Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se recogió el medio, se centrifugó, se filtró a través de un sistema de filtración de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA) y se concentró entonces con un filtro de centrifuga Centricon® (Millipore, Billerica, MA). Se mezcló el medio concentrado 1:1 con tampón de unión (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) y se cargó entonces en columna de A/G preequilibrada (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) o HI trap rProtein A FF de GE Healthcare, Waukesha, WI. Se lavó la columna cargada con tampón de unión y se eluyó con tampón de elución (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Se neutralizó inmediatamente el anticuerpo eluido y se dializó frente a tampón PBS durante una noche. Se concentró el anticuerpo dializado con un
 50 filtro de centrifuga Amicon (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) y se determinó la concentración de proteína por DO₂₈₀ nm con un coeficiente de extinción de 1,34 mg/ml. Se analizó el anticuerpo purificado usando SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA) o Protein Labchip (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA). Se desarrolló la PAGE-SDS en condiciones no reductoras.

60 Se llevó a cabo la mutagénesis de la asparagina en posición 33 (N33) de CDR1 de la cadena ligera para el anticuerpo 19.3 a N33S (SEQ ID NO: 55), N33T (SEQ ID NO: 56), N33E (SEQ ID NO: 67) o N33D (SEQ ID NO: 68) mediante mutagénesis dirigida a sitio a partir del vector de expresión WT pV1JASN-GS-19.3-LCK usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange II XL (Agilent Technologies, La Jolla, CA). Se mutó el codón AAT de N a AGT de S en 19.3S33 (SEQ ID NO: 55), ACT de T en 19.3T33 (SEQ ID NO: 56), GAA de E en 19.3E33 (SEQ ID NO:

67) o GAT de D en 19.3D33 (SEQ ID NO: 68), y se confirmaron los nuevos codones en esa posición por secuenciación de ADN. Para generar anticuerpos de IgG completos para estos mutantes, se aparearon los plásmidos de cadena ligera respectivos con el plásmido de cadena pesada relacionado, pV1JNSA-19.3-HCG2, para transfección transitoria en células 293 FreeStyle (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se describieron los procedimientos de expresión y purificación anteriormente en este ejemplo. Se incubaron alícuotas de anticuerpos mutantes purificados junto con el anticuerpo original 19.3 (SEQ ID NO: 1) bajo diversas condiciones a 4, 25 o 40 °C durante un mes antes de someter al análisis de ELISA mostrado en las Figuras 4A-4C.

Ejemplo 4

Caracterización de anticuerpos anti-ADDL

Se valoraron en primer lugar los anticuerpos anti-ADDL seleccionados, concretamente aquellos derivados del anticuerpo original, h3B3, en un ELISA de A β de 3 vías para evaluar la unión del anticuerpo a A β monomérico, ADDL y A β fibrilar. Como se muestra en la Figura 1, con la excepción del anticuerpo 9.2, todos los anticuerpos anti-ADDL mostraban unión preferencial a ADDL respecto a h3B3, comparadores selectivos (Comp 1 y 3: se unen solo a ADDL) y no selectivos (Comp 2: se une a todas las formas de A β evaluadas) y control (sin anticuerpo). El anticuerpo 9.2 mostraba una baja unión a todas las formas de A β , lo que sugería que su afinidad de unión se afectaba negativamente durante la conversión en IgG y/o producción de anticuerpo. Se generó una curva de titulación completa (Figura 2) para cada anticuerpo y h3B3 para determinar su afinidad de unión por ADDL, en comparación con A β monomérico. A pesar de que 6 de los 7 anticuerpos madurados por afinidad mostraban unión preferencial a ADDL, los solicitantes han mostrado anteriormente que algunos anticuerpos anti-ADDL que tienen unión preferencial a ADDL no son capaces de prevenir la unión de ADDL a neuronas hipocámpicas primarias (Shughrue, y col., 2010, Neurobiol. Aging. 31: 189-202, Figura 1).

Ya que la unión preferencial a ADDL solos puede no ser un indicador exacto de efectividad, sería deseable identificar anticuerpos anti-ADDL que bloquearan también la unión de ADDL a neuronas, lo que puede evaluarse en un ensayo de unión basado en células como sigue. Se preincubaron los anticuerpos con ADDL y se añadieron entonces a cultivos hipocámpicos primarios para valorar su bloqueo de la unión de ADDL. Los resultados de este estudio mostraban que los anticuerpos anti-ADDL de la presente memoria, específicamente el anticuerpo 19.3, reducían drásticamente la unión de ADDL a neuronas (Figura 3). Sin embargo, se observó una marcada reducción de la actividad del anticuerpo en este ensayo cuando los anticuerpos se desnaturalizaban térmicamente (Figura 3).

Determinación de la CE50. Se recubrieron placas de alta unión a proteína (Costar, Coming, Lowell, MA), con ligando diana en PBS durante una noche a 4 °C. La concentración de proteína de recubrimiento era de 100 pmol/pocillo para A β 40 (American Peptide, Sunnyvale, CA) y de 50 pmol/pocillo para ADDL. Se generaron los ADDL como se describe en el Ejemplo 1B. Al día siguiente, se lavaron las placas 5 veces con PBS + 0,05 % de Tween-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y se bloquearon durante una noche con tampón de bloqueo de caseína (ThermoScientific, Waltham, MA) y 0,05 % de Tween-20. Se ensayaron tres anticuerpos representativos, 19.3 (Fig. A), 19.3S33 (Fig. 4B) y 19.3T33 (Fig. 4C), generados como se describe en el Ejemplo 3, a 15 μ g/ml a 0 μ g/ml en una serie de dilución triple de 12 puntos. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se añadió IgG anti-humana conjugada con fosfatasa alcalina (ThermoScientific, Waltham, MA) a 0,08 μ g/ml. Después de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se añadió sustrato quimioluminiscente Tropix® CDP®-Star (Life Technologies™, Carlsbad, CA). Se detectó la luminiscencia después de 30 minutos en un lector de microplacas EnVision® (PerkinElmer, Waltham, MA). Se completaron los ajustes de curva usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Ejemplo 5

Unión a FcRN *in vitro* de anticuerpos anti-ADDL

Para caracterizar la capacidad de los anticuerpos anti-ADDL de unirse a y disociarse de FcRn humano inmovilizado, se evaluaron los 7 anticuerpos anti-ADDL de la presente memoria en un ensayo de unión a FcRn de Biacore, un sistema indirecto usado para evaluar la PK del anticuerpo y predecir la semivida terminal ($t_{1/2}$) de los anticuerpos en primates no humanos.

Brevemente, se inmovilizó proteína FcRn humana purificada en un chip biosensor CM5 de Biacore y se usó PBSP (NaPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM y 0,05 % (v/v) de Surfactant 20) a pH 7,3 como tampón de desarrollo. Se diluyeron los AcM con PBSP a pH 6,0 a 100 nM, se dejaron unir a FcRn durante 3 min para alcanzar el equilibrio y siguió la disociación en tampón de desarrollo a pH 7,3. Se insertó un punto indicador (estabilidad) a los 5 segundos después del final de la unión de AcM y se calculó el “% unido” como $UR_{estabilidad}/UR_{unión}$ (%). Los solicitantes encontraron que los anticuerpos monoclonales (AcM) con secuencias de Fc idénticas pero dominios Fab diferentes pueden unirse a y disociarse de FcRN con diferencias considerables (datos no mostrados). Además, se observó una correlación aparente entre la disociación a pH neutro y la farmacocinética *in vivo*, en que los AcM con fracciones de disociación

lenta (concretamente, mayor “% unido”) tendían a exhibir $t_{1/2}$ más cortas *in vivo*. Se usó este rasgo como herramienta de cribado *in vitro* para la farmacocinética de anticuerpo.

Se hizo una comparación de los 7 anticuerpos anti-ADDL de la presente memoria, junto con h3B3, dos anticuerpos que prefieren ADDL (Comp 1 y 3) y un comparador no selectivo (Comp 2: se une a todas las formas de A β evaluadas) en el ensayo de unión a FcRn. Se generó un sensorgrama (Figura 5) que muestra la unión inicial del anticuerpo a pH 6,0 y la disociación después del anticuerpo a pH 7,3 a partir de 180 segundos. Como se muestra en la Figura 5, había una notable diferencia entre h3B3 y los demás anticuerpos ensayados. Aunque h3B3 tenía un alto porcentaje unido a FcRn, los 7 anticuerpos anti-ADDL de la presente invención, así como los dos anticuerpos comparativos, exhibían una unión considerablemente menor.

Ejemplo 6

Caracterización del anticuerpo anti-ADDL 19.3

Se seleccionó el anticuerpo madurado por afinidad 19.3 para caracterización adicional. Se determinó la secuencia de ADN completa y la secuencia aminoacídica deducida para la región variable de la cadena ligera, SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente. Se muestra el alineamiento de las regiones variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 17) y ligera (SEQ ID NO: 15) en la Figura 6A, junto con la secuencia de línea germinal más cercana (SEQ ID NO: 47). Se muestra en la Figura 6B un modelo tridimensional de las regiones variables de cadena pesada y ligera y la localización de las 6 regiones determinantes de la complementariedad (CDR).

Se llevaron a cabo los análisis Biacore™ (GE Healthcare, Waukesha, WI) y KinExA (Sapidyne, Boise, ID) para establecer la afinidad de unión del anticuerpo anti-ADDL 19.3 por ADDL y determinar la selectividad de 19.3 por ADDL frente a A β monomérico. Se usan ampliamente las tecnologías basadas en Biacore™ y KinExA para la medida de la afinidad de unión entre macromoléculas tales como anticuerpos y dianas proteicas. En la tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) en que está basada Biacore™, las medidas cuantitativas de la interacción de unión entre una o más moléculas dependen de la inmovilización de una molécula diana en la superficie del chip sensor. Los copartícipes de unión a la diana pueden capturarse a medida que pasan por el chip. La resonancia de plasmón de superficie (SPR) detecta cambios en la masa de la capa acuosa cercana a la superficie del chip sensor midiendo cambios en el índice de refracción. Cuando las moléculas de la solución de ensayo se unen a una molécula diana, aumenta la masa (k_a), cuando se disocian baja la masa (k_d). Este sencillo principio forma la base del sensorgrama, una monitorización continua inmediata de la asociación y disociación de las moléculas en interacción. El sensorgrama proporciona información cuantitativa inmediata sobre la especificidad de unión, la concentración activa de molécula en una muestra, la cinética y la afinidad.

La tecnología KinExA de Sapidyne Instruments, Boise, Idaho, mide las constantes de unión para caracterizar eventos de unión biomolecular en fase de solución y no eventos de unión entre una fase de solución y una fase sólida. En solución, los copartícipes de unión alcanzan el equilibrio después de una incubación suficiente. Se cuantifican las moléculas no unidas con una titulación, que reflejará la porción de moléculas unidas a los copartícipes. El procedimiento KinExA no requiere la modificación de las moléculas bajo estudio. Con KinExA, la reacción que se está midiendo ocurre entre moléculas no modificadas en solución. Por lo tanto, se eliminan los problemas de cómo la modificación altera las reacciones de unión “nativas”. El procedimiento KinExA permite un intervalo más amplio de constantes de unión tan ajustado como 10^{-13} M. El software KinExA efectúa análisis de datos que están basados en soluciones exactas de ecuaciones de unión clásicas (matemáticas de k_d), no aproximaciones de pseudoprimer orden. El KinExA no requiere manipulaciones de datos arbitrarias ni selecciones de intervalo.

Como se muestra en la Tabla 6, el anticuerpo 19.3 tenía una afinidad de 4,8 nM por ADDL en comparación con una afinidad de 150 nM por A β monomérico en el ensayo Biacore™. La selectividad 30 veces mayor del anticuerpo 19.3 por ADDL frente a A β monomérico era notablemente mejor que la observada para el anticuerpo original, h3B3, que exhibía solo una preferencia de 10 veces por ADDL frente a A β monomérico.

Tabla 6

Anticuerpo	ADDLs (nM)	A β 1-40 (nM)	Relación (monómero de A β /DDL)
3B3	10.0	104.6	10
19.3	4.8	150.0	31

De forma similar, se evaluó el anticuerpo 19.3 en una medida de la constante de equilibrio basada en KinExA. Como

se muestra en la Tabla 7, el anticuerpo 19.3 tenía una constante de equilibrio de 2,7 nM, que representa una preferencia de más de 6 veces por oligómeros de ADDL frente a monómero de A β 40 en el mismo ensayo.

Tabla 7

Anticuerpo	ADDLs (nM)	A β 1-40 (nM)	Relación (monómero de A β /DDL)
3B3	3.3	45.0	13.6
19.3	2.7	16.7	6.2

Ejemplo 7

10 **Caracterización biofísica del anticuerpo anti-ADDL 19.3**

Se llevó a cabo la caracterización biofísica para valorar el potencial de formación de agregados de anticuerpo para mostrar que los anticuerpos anti-ADDL de la presente memoria son estables en condiciones de estrés y adecuados para uso como producto terapéutico. Se concentró el anticuerpo anti-ADDL 19.3 a >50 mg/ml y se dispuso en una serie de formulaciones con un pH en el intervalo de 5,0 a 8,0. Se incubaron dos conjuntos de muestras a 37 y 45 °C durante 1 semana. Se dispuso un tercer conjunto de muestras a -70 °C para iniciar una serie de cinco ciclos de congelación/descongelación. El análisis de cromatografía de exclusión por tamaño indicaba que las preparaciones de anticuerpo estaban predominantemente (>95 %) en estado monomérico, con pequeñas cantidades de dímeros que eran típicas de preparaciones de anticuerpo monoclonal. La cantidad de dímeros y oligómeros de mayor peso molecular no aumentaba después del estrés térmico en todos los tampones y no se observó fragmentación. Como se resume en la Tabla 8, el análisis de turbidez por ultravioleta cercano indicaba también falta de agregación. Las muestras con estrés de congelación/descongelación mostraban un aumento de la turbidez dependiente del tampón que era comparable a otros anticuerpos monoclonales. La viscosidad a 50 mg/ml era menor de 2 cP, indicando una viscosidad de inyección aceptable, ya que el nivel de 20 cP se considera generalmente que es un límite práctico para inyecciones subcutáneas. La calorimetría de barrido diferencial revelaba también una termoestabilidad aceptable, con desplegamiento de Fab a aproximadamente 72 °C y desplegamiento del dominio menos estable CH2 por encima de 65 °C. Tomado en conjunto, el anticuerpo 19.3 demostraba una muy buena estabilidad estructural, con propiedades biofísicas compatibles con el suministro subcutáneo.

Tabla 8

Anticuerpo	Agregados iniciales (%)	Fragmentos iniciales (%)
19.3	2.2	0.0
Control 1	11.6	0.4
Control 2	2.6	0.0

Ejemplo 8

35 **Análisis farmacocinético de 19.3 y de eficacia en un modelo de EA**

A. Farmacocinética en ratones con FcRn humano

Se han sugerido recientemente los ratones con FcRn humano (Tg276 heterocigóticos) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) como un sistema indirecto valioso para evaluar la farmacocinética de anticuerpos monoclonales. Para caracterizar la farmacocinética del anticuerpo anti-ADDL 19.3 en ratones con FcRn humano, 3 animales recibieron una única inyección intravenosa de anticuerpo 19.3 a 10 mg/kg en la vena de la cola. Se recogieron entonces una serie de 10 μ l de muestras de sangre en los puntos temporales 0, 25, 50, 75, 100, 150, 250 y 350 horas después de la administración IV del anticuerpo 19.3 o h3B3, y se usó un inmunoensayo de IgG anti-humana validado para determinar los niveles sanguíneos del anticuerpo. Como se muestra en la Figura 7, los niveles sanguíneos de anticuerpo 19.3 bajaban de manera bifásica, con una $t_{1/2}$ aparente de 77 ± 6 horas, que era considerablemente mayor que la semivida para el anticuerpo original, h3B3, de aproximadamente 29 ± 9 horas. Estas semividas estaban de acuerdo con la diferencia predicha en el ensayo de unión a FcRn *in vitro* (Figura 5). Se determinó la semivida terminal en fase de eliminación usando el modelo no compartimentado (WinNonlin®, Pharsight, Sunnyvale, CA) y los puntos de datos entre los días 3 y 15 después de la dosis.

B. Estudio farmacocinético en primates no humanos

55 Para confirmar la $t_{1/2}$ predicha de 19.3 en primates, se realizó un estudio farmacocinético en primates para el

anticuerpo anti-ADDL 19.3 en una cohorte de monos Rhesus con puerto en la cisterna magna. Se dosificaron a 6 animales (3 machos/3 hembras) una única inyección en bolo intravenoso o subcutánea de anticuerpo 19.3 (5 mg/kg) y se recogieron muestras de sangre después de la administración de anticuerpo. Al mismo tiempo, se recogieron muestras de LCR del puerto en la cisterna magna a las 0, 2, 4, 8, 12, 24, 30, 48, 54 y 72 horas y se determinó la concentración del anticuerpo 19.3 en el suero y LCR con un ensayo de ELISA de IgG antihumana. Cuando se administró a los animales una inyección en bolo IV única de anticuerpo 19.3, se observó una $t_{1/2}$ de 254 ± 28 horas, mientras que se observó una $t_{1/2}$ de 204 ± 49 horas después de administración subcutánea (Figura 8). Además, los solicitantes encontraron que el anticuerpo 19.3 era capaz de cruzar al LCR de primates, donde aumentaba de concentración durante las primeras 48 horas y alcanzaba el máximo a aproximadamente 0,1 % del anticuerpo dosificado (Figura 9).

C. Distribución del anticuerpo anti-ADDL 19.3 marcado con ^{125}I en cerebro de ratón

En un intento por determinar la concentración de anticuerpo que alcanzaba el cerebro, se inyectaron en dos ratones Tg2576 macho de 12 meses (línea B6; SJL-TgN APPSWE) (vena de la cola) 200 μg de anticuerpo 19.3 marcado con ^{125}I (~ 8 mg/kg), o uno o dos anticuerpos comparativos, y se recogió la sangre y el LCR 2 horas después. Se despejó la radiactividad residual de los vasos del cerebro mediante perfusión cardiaca con PBS antes de la retirada del cerebro. Se dispuso entonces una muestra de sangre, LCR y el cerebro completo en un contador gamma para determinar la cantidad de anticuerpo radiomarcado presente en cada muestra. Después de contar, se fijaron los cerebros con paraformaldehído al 4 % durante 48 horas y se procesaron entonces para inmunocitoquímica por flotación. Se detectó la localización del anticuerpo 19.3 en el cerebro de ratón con un anticuerpo secundario antihumano y un procedimiento de detección ABC estándar. Se combinó esta inmunoreactividad entonces con tinción con tioflavina S (un tinte que detecta placas) para determinar la colocalización del anticuerpo con placas en el cerebro de ratón.

Como se muestra en las Figuras 10A y 10B, el anticuerpo 19.3 radiomarcado era capaz de penetrar la barrera hematoencefálica hasta el LCR y cerebro de ratón. Además, los datos indicaban que el anticuerpo 19.3 estaba enriquecido en el cerebro (0,19 %) cuando se comparaba con los niveles observados en el LCR (0,02 %). Para determinar si esta concentración en el cerebro era debida a la asociación del anticuerpo 19.3 con $\text{A}\beta$, se fijaron los cerebros y se procesaron para inmunocitoquímica. El análisis de la distribución de anticuerpo en el cerebro de ratón Tg2576 anciano reveló que el anticuerpo 19.3 estaba asociado a placas amiloides positivas de tioflavina S en el cerebro (Figura 10C y 10D). Estos datos proporcionaban la primera evidencia de que el anticuerpo 19.3 era capaz de penetrar en el cerebro de ratón transgénico y unirse a la especie de $\text{A}\beta$ de interés.

Ejemplo 9

Modelo de deposición en placas

Para valorar adicionalmente la capacidad del anticuerpo anti-ADDL 19.3 de reducir la deposición de ADDL en placas amiloides en el cerebro, se canularon unilateralmente semanalmente ratones Tg2576 macho de 12 meses (Taconic, NY) y se infundieron bADDL (50 pmol/ μl) semanalmente durante 4 semanas en el hipocampo (Figura 11A). Una semana después del último tratamiento con bADDL, se dosificó a la mitad de los ratones ($n=5/\text{tratamiento}$) (vena de la cola) semanalmente durante 4 semanas PBS, mientras que a los animales restantes se dosificaron semanalmente después del último tratamiento y se procesaron sus cerebros para inmunocitoquímica. Para la detección de bADDL y placas, se incubaron secciones de cerebro con estreptavidina Alexa Fluor® 594 (Invitrogen, Carlsbad, CA), se montaron en portaobjetos y se tiñeron las placas con tioflavina S. Se capturaron entonces imágenes fluorescentes de las placas con un PerkinElmer Rapid Confocal Imager con software UltraVIEW ERS y se cuantificó la diferencia en el crecimiento de placa. Los detalles de este modelo se han publicado recientemente (Gaspar y col., 2010, Exp. Neurol., 223: 394-400). Después de un mes de tratamiento, se observó una reducción significativa de la deposición de nuevos ADDL en las placas existentes en los animales tratados con el anticuerpo 19.3 (Figura 11C), cuando se comparaba con los animales tratados con vehículo solo (Figura 11B).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merck Sharp & Dohme Cop. Gaspar, Renee Shughrue, Paul Wang, Fubao Wang, Weirong Zhang, Ningyan Zhao, Wei-Qin Xu, Min McCampbell, Alexander

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-ADDL Y USOS DE LOS MISMOS

<130> MRL-NOP-00097

<150> 61/364,210

<151> 2010-07-14

ES 2 573 135 T3

<160> 68

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

5 <210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 1

15 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética

<400> 2

25 Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética

35 <221> VARIANTE
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Arg, Lys o Tyr

40 <221> VARIANTE
 <222> (6) ... (6)
 <223> Xaa = Val, Ala, o Leu

45 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Pro, His, o Gly

<221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Ala, Pro, o Val

50 <221> VARIANTE
 <222> (9) ... (9)
 <223> Xaa = Ser, Gly, o Phe

55 <400> 3

Phe Gln Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

60 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT

ES 2 573 135 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

5 <400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His
1 5 10

10 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> sintética

<400> 5

Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

20 Gly

<210> 6
<211> 8
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

30 <400> 6

Gly Ile Thr Thr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 7

35 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> sintética

<400> 7

Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Ala Ser
1 5

45 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> sintética

<400> 8

55 <210> 9

Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Pro Gly
1 5

ES 2 573 135 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintética
 <400> 9

10 Phe Gln Gly Ser Lys Ala His Pro Ser
 1 5

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

15 <220>
 <223> sintética
 <400> 10

20 Phe Gln Gly Ser Arg Leu Gly Pro Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética
 <400> 11

30 Phe Gln Gly Ser Tyr Ala Pro Pro Gly
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética
 <400> 12

40 Phe Gln Gly Ser Arg Ala Pro Pro Phe
 1 5

45 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> sintética
 <400> 13

55 Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Val Arg
 1 5

<210> 14
 <211> 354
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

5

<400> 14

```

gcttctagag atgtggtgat gaccagagc cccctgtccc tgcctgtgac ccctggcgag 60
cctgccagca tctcctgccg gagctcccag agcatcgtgc actccaatgg caacacctac 120
ctggagtggg acctgcagaa gcctggccag agccccagc tgctgatcta caaggcttcc 180
aaccggttct ccggcgtgcc tgaccggttc agcggctccg gcagcggcac agacttcacc 240
ctgaagatca gccgggtgga ggctgaggat gtgggcgtct actactgctt ccagggcagc 300
cggcttggtc ctagttttgg ccagggcacc aagctggaga tcaagcgtac ggtg      354
    
```

10

<210> 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> sintética

<400> 15

```

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

20

<210> 16

<211> 351

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

30

<400> 16

```

gaggtgcagc tgggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgcccgtg 60
agctgtgctg cctctggctt caccttcagc tcctttggca tgcactgggt gcgccaggcc 120
cctggcaagg gcctggagtg ggtggcctac atcagccggg gctccagcac catctactat 180
gctgacacag tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca atgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcagatga acagcctgcg ggctgaggac acagcagtgt actactgtgc ccggggcatc 300
accacagccc tggactactg gggccagggc accctggtga ccgtgtccag c      351
    
```

35

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

5 <400> 17

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

<210> 18
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> sintética

15

<400> 18

cgtacggtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60
ggaactgcct	ctgttgtgtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	120
tggaaggtgg	ataacgccct	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	ttag				324

20

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> sintética

<400> 19

30

ES 2 573 135 T3

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

<210> 20
 <211> 981
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

10 <400> 20

```

gcatccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcc 120
tggaaactctg gcgccctgac ctctggcgtg cacaccttcc ctgctgtgct gcaatcctct 180
ggcctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccatcct ccaacttcgg caccagacc 240
tacacatgca atgtggacca caagccatcc aacaccaagg tggacaagac agtggagcgg 300
aagtgtctgtg tggagtgcc ccatgcccct gcccccctg tggctggccc atctgtgttc 360
ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggaccctga ggtgacctgt 420
gtggtggtgg acgtgtccca tgaggacct gaggtgcagt tcaactggtg tgtggatggc 480
gtggaggtgc acaatgccaa gaccaagccc cgggaggagc agttcaactc caccttccgg 540
gtggtgtctg tgctgacagt ggtgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtgtcca acaagggcct gcctgcccc atcgagaaga ccatctcaa gaccaagggc 660
cagccccggg agccccaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc ttctaccat ccgacattgc tgtggagtgg 780
gagtccaatg gccagcctga gaacaactac aagaccacc ccccatgct ggactctgat 840
ggctccttct tcctgtactc caagctgaca gtggacaagt cccgggtggca gcagggcaat 900
gtgttctcct gctctgtgat gcatgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccttg 960
tcctgtccc ctggcaagtg a
    
```

15 <210> 21
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 21

ES 2 573 135 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

5 <210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 22
 tatggcttct agagatgtgg tgatg 25

15 <210> 23
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<221> característica_misc
 <222> (0)...(0)
 <223> M = A o C

5 <221> característica_misc
 <222> (0)...(0)
 <223> N = A, C, G, o T

<400> 23

10 **tgcagccacc gtacgcttga tctccagctt ggtgccctgg ccaaaggtgg ggggcacmnn 60**
mnmnmnmnm nngcagtagt ag 82

<210> 24
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

20 <221> característica_misc
 <222> (0)...(0)
 <223> M = A o C

25 <221> característica_misc
 <222> (0)...(0)
 <223> N = A, C, G, o T

<400> 24

30 **tgcagccacc gtacgcttga tctccagctt ggtgccctgg ccaaamnmnm nmnmnmnmnm 60**
gctgccctgg 70

<210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

40 <400> 25
 agcgccct cgaggagtg cagc 24

<210> 26
 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética
 <221> característica_misc
 <222> (0)...(0)
 <223> M = A o C

55 <221> característica_misc
 <222> (0)...(0)
 <223> N = A, C, G, o T

<400> 26

60 **agaccgatgg gcccttggtg gaggcgctgg acacggtcac cagggtgccc tggccccamn 60**
nmnmnmnmnm mnnngtgatg ccc 83

ES 2 573 135 T3

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

<210> 35
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintética

10

<400> 35

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

15

<210> 36
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> sintética

<400> 36

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

25

<210> 37
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> sintética

5 <400> 37

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

<210> 38
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> sintética

15

<400> 38

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

20

<210> 39
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> sintética

<400> 39

30

ES 2 573 135 T3

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

<210> 40
 <211> 95
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 40

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

15 <210> 41
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 41

ES 2 573 135 T3

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

<210> 42
 <211> 443
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

10 <400> 42

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

ES 2 573 135 T3

				165					170					175			
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn		
			180					185					190				
Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn		
		195					200					205					
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro		
	210					215					220						
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro		
225					230					235					240		
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr		
				245						250					255		
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn		
			260					265					270				
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg		
		275					280					285					
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val		
	290					295					300						
Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser		
305					310					315					320		
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys		
				325						330					335		
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu		
			340					345					350				
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe		
	355						360					365					
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu		
	370					375					380						
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe		
385					390					395					400		
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly		
				405					410						415		
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		
			420					425					430				
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
		435					440										

<210> 43
 <211> 330
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

10 <400> 43

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	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	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	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> 44
- <211> 326
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> sintética
- 10 <400> 44

ES 2 573 135 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

5 <210> 45
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 45

ES 2 573 135 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 46
 <211> 326
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

10 <400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 47
 <211> 25
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

10 <400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

15 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 573 135 T3

<220>
 <223> sintética

5 <400> 48

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

<210> 49
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

<400> 49

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

20 <210> 50
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

<400> 50

30 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

40 <400> 51

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

45 <210> 52
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> sintética

<400> 52

ES 2 573 135 T3

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

5 <210> 53
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética
 <221> VARIANTE
 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Asn o Ser

15 <221> VARIANTE
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Asn, Gln, Asp, Ser, His, o Ala

20 <400> 53

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Xaa	Gly	Xaa	Thr	Tyr	Leu	Glu
1				5					10					15	

25 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Asn, Gln, Ala, o Ser

35 <400> 54

Lys	Ala	Ser	Xaa	Arg	Phe	Ser
1				5		

40 <210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética
 <400> 55

50 <400> 55

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu
1				5					10					15	

55 <210> 56
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

ES 2 573 135 T3

<400> 56

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

5 <210> 57
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 57

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

15 <210> 58
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

25 <400> 58

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly His Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

30 <210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintética

<400> 59

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Gln Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

40 <210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

<400> 60

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

50 <210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sintética

ES 2 573 135 T3

<400> 61

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

5

<210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Sintética

<400> 62

15

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

20

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Sintética

30

<400> 63

Lys Ala Ser Gln Arg Phe Ser
 1 5

35

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Sintética

<400> 64

Lys Ala Ser Ser Arg Phe Ser
 1 5

45

<210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Sintética

<400> 65

Lys Ala Ser Thr Arg Phe Ser
 1 5

55

<210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a ligandos difusibles derivados de amiloide β , que comprende:
- 5 (a) una región variable de cadena ligera que comprende,
- (i) una CDR1 de SEQ ID NO: 1,
 10 (ii) una CDR2 de SEQ ID NO: 2, y
 (iii) una CDR3 de SEQ ID NO: 10; y
- (b) una región variable de cadena pesada que comprende,
- 15 (i) una CDR1 de SEQ ID NO: 4,
 (ii) una CDR2 de SEQ ID NO: 5, y
 (iii) una CDR3 de SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, donde la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 15 y la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 17.
- 20 3. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, que comprende además una región constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 21.
- 25 4. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
5. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 6. Un procedimiento *in vitro* para atenuar la unión de ligandos difusibles derivados de amiloide β a una neurona, que comprende poner en contacto la neurona con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 de modo que se atenúe la unión de ligandos difusibles derivados de A β a la neurona.
- 35 7. Un procedimiento para inhibir el ensamblaje de ligandos difusibles derivados de amiloide β , que comprende poner en contacto una muestra que contiene péptidos 1-42 de amiloide β con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, inhibiendo así el ensamblaje de los ligandos difusibles derivados de A β .
- 40 8. Un procedimiento para inhibir la fosforilación de proteína tau en Ser202/Thr205, que comprende poner en contacto una muestra que contiene una proteína tau con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, inhibiendo así la fosforilación de proteína tau en Ser202/Thr205.
- 45 9. Una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 5 para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o trastornos similares relacionados con la memoria asociados a la acumulación de ADDL.
- 50 10. Un procedimiento para identificar un presunto agente terapéutico que atenúa la unión de ligandos difusibles derivados de amiloide β a neuronas, que comprende
- (a) poner en contacto una composición que comprende una neurona con ligandos difusibles derivados de amiloide β en presencia de un agente;
 (b) poner en contacto la composición con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1; y
 (c) detectar la cantidad de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en presencia del agente,
- 55 donde un descenso de la cantidad de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en presencia del agente, en comparación con la cantidad de anticuerpo unida en ausencia del agente, indica que el agente es un presunto agente terapéutico para atenuar la unión de ligandos difusibles derivados de amiloide β a neuronas.
- 60 11. Un procedimiento para detectar ligandos difusibles derivados de amiloide β en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 y determinar la presencia de un complejo que comprende los ligandos difusibles derivados de amiloide β y dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.
12. Un procedimiento para diagnosticar una enfermedad asociada a ligandos difusibles derivados de amiloide β , que comprende poner en contacto una muestra con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la

reivindicación 1 y determinar la presencia de un complejo que comprende los ligandos difusibles derivados de amiloide β y dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, donde el complejo es un diagnóstico de enfermedad asociada a ligandos difusibles derivados de amiloide β .

- 5 **13.** Un kit para detectar ligandos difusibles derivados de amiloide β , que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1.

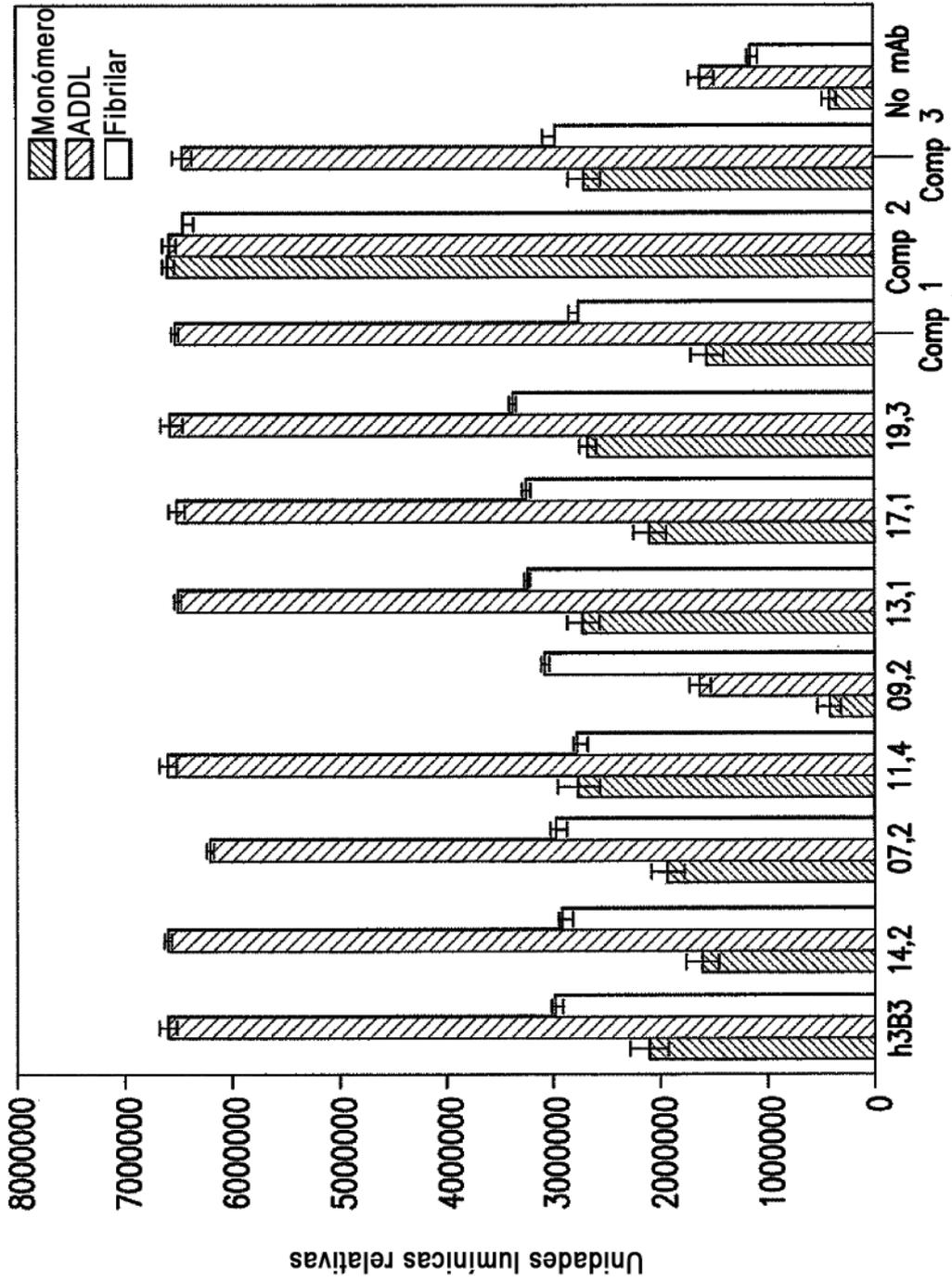


FIG.1

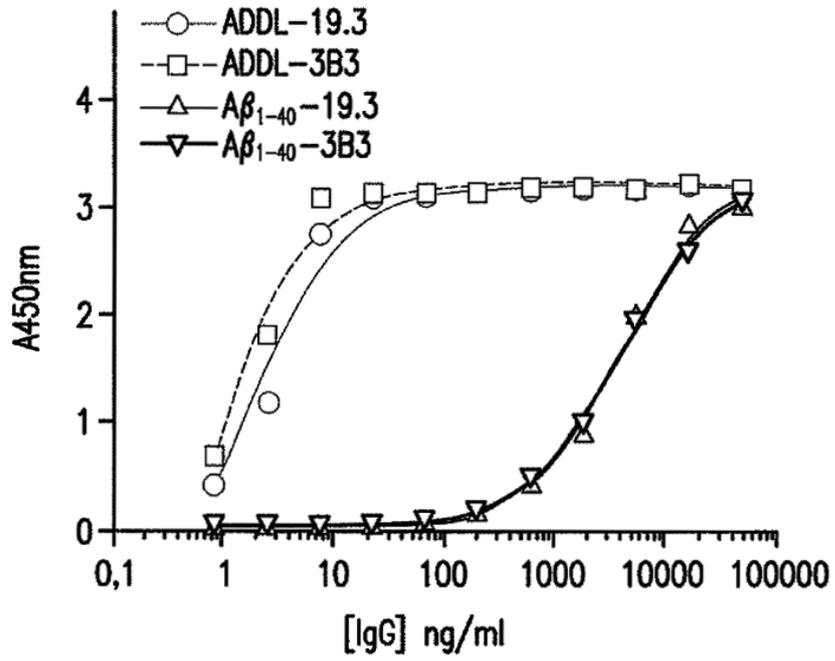


FIG.2

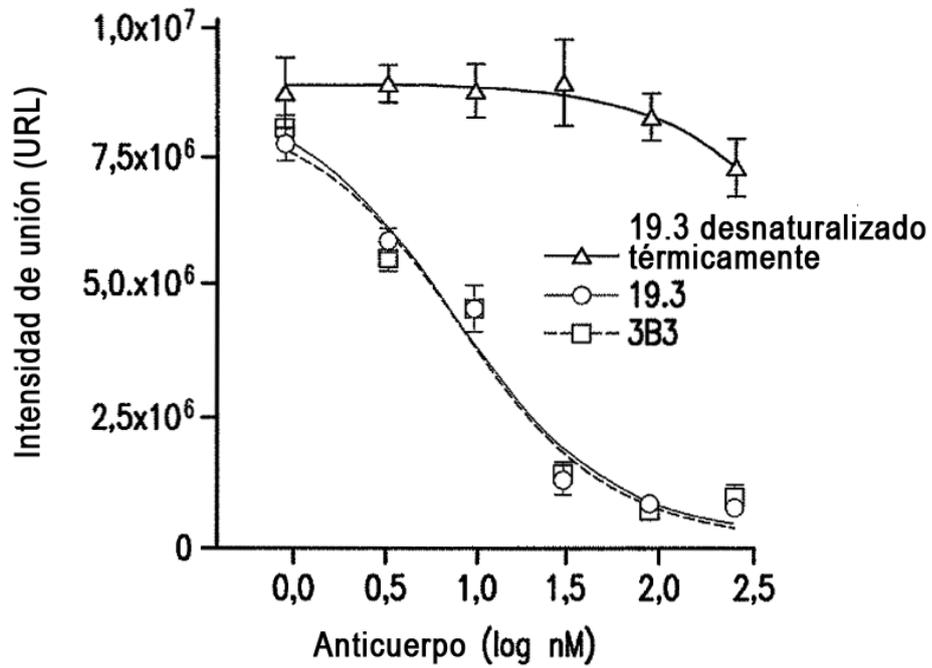


FIG.3

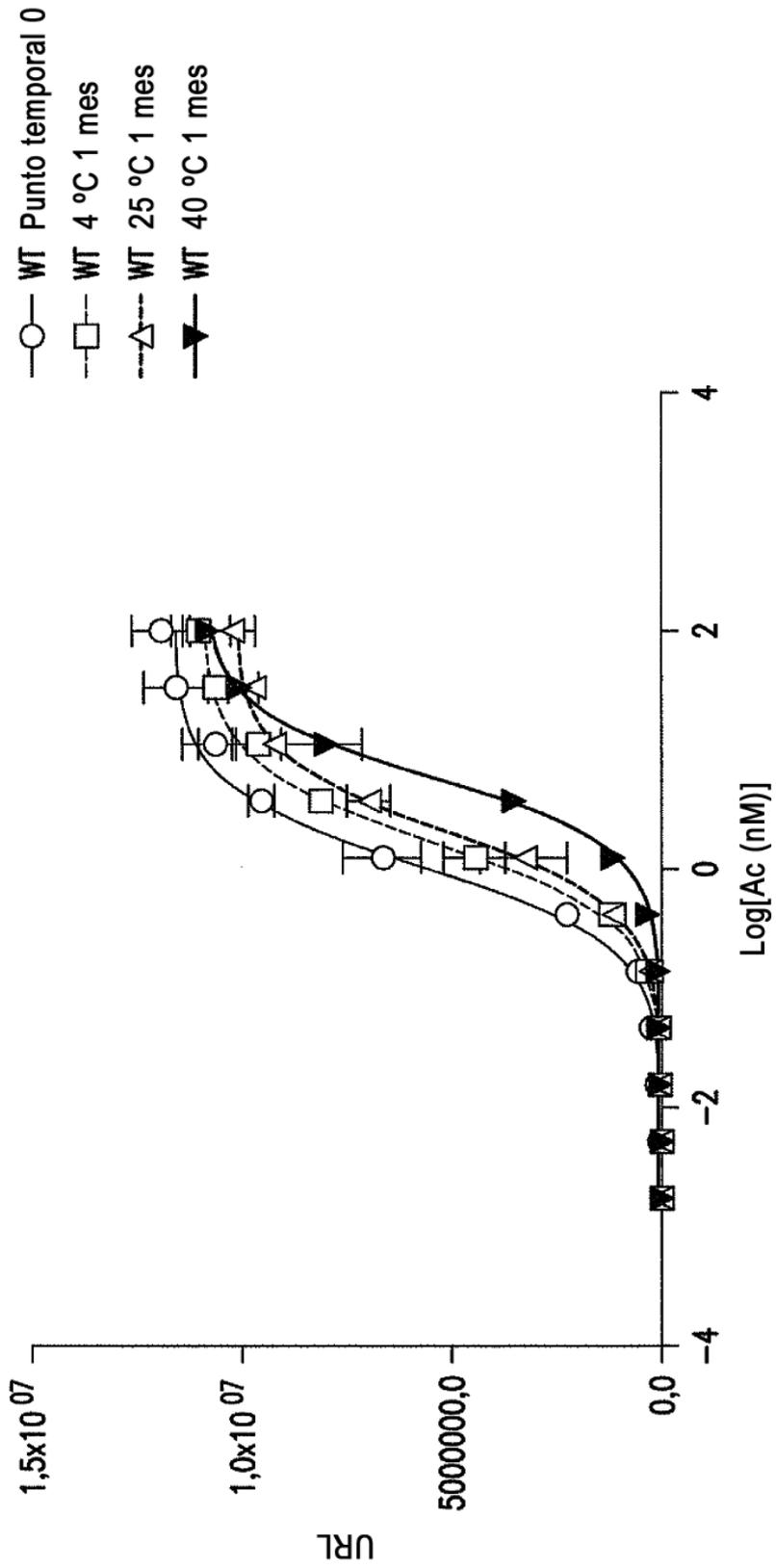


FIG.4A

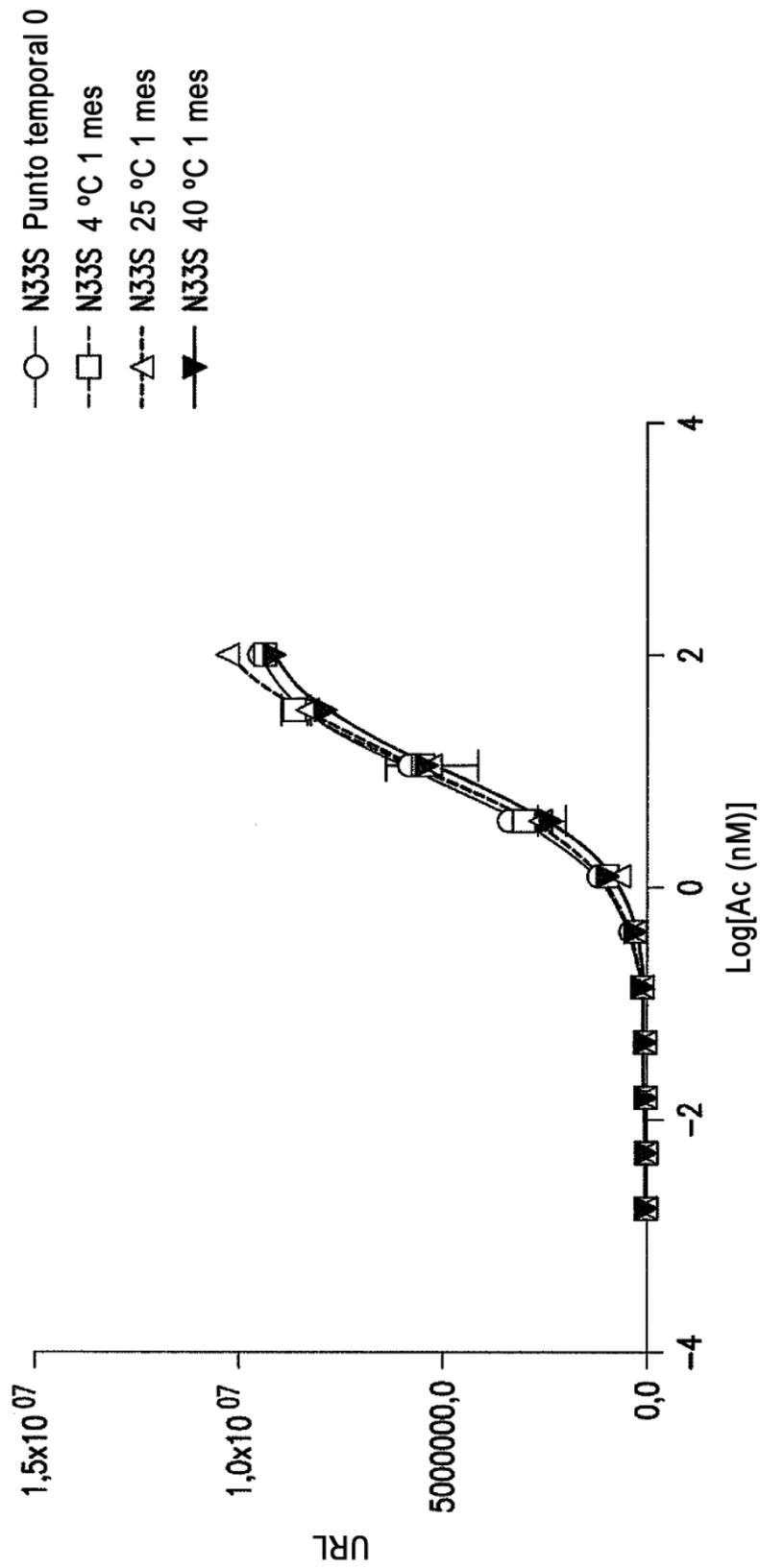


FIG.4B

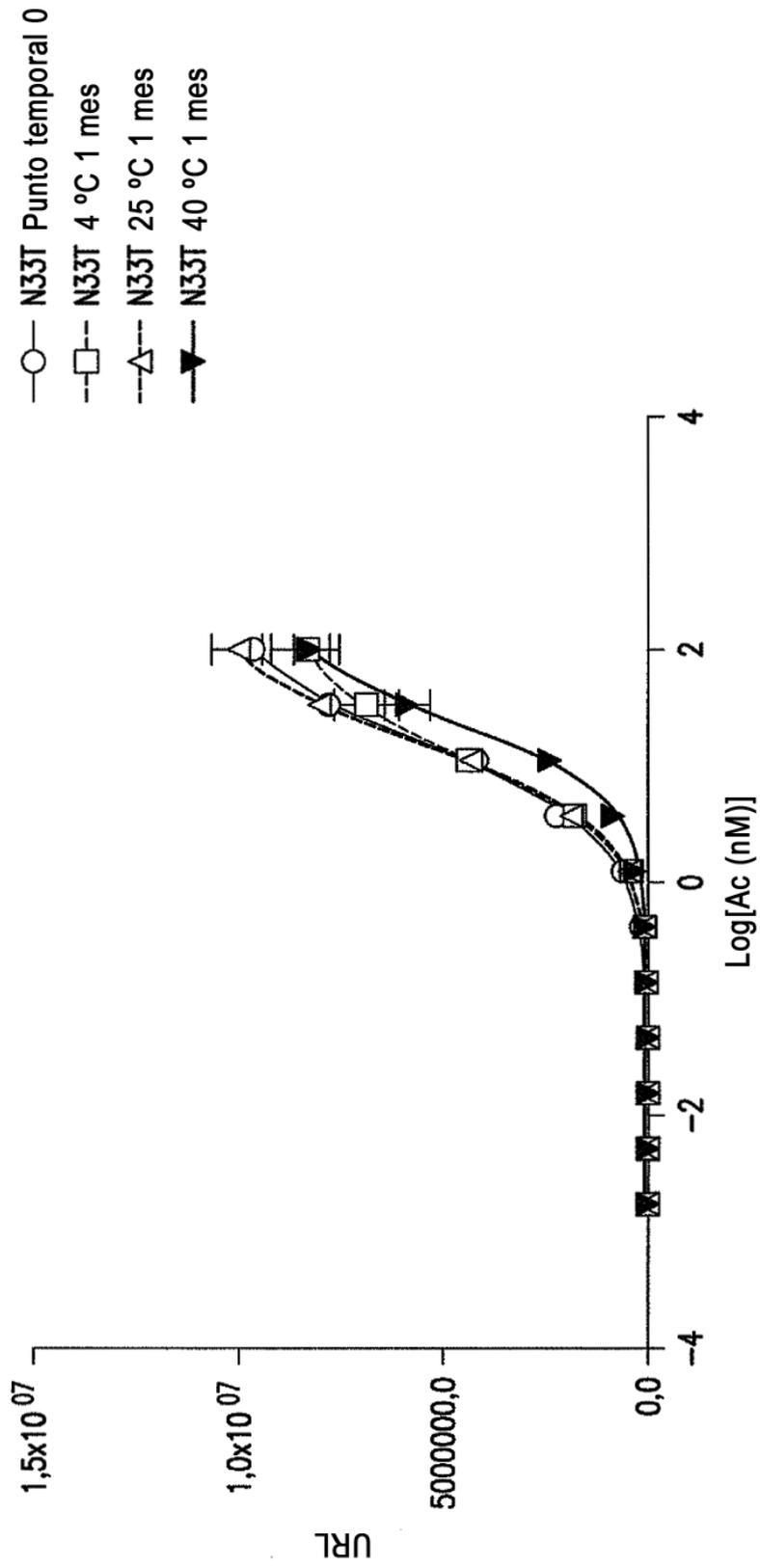


FIG.4C

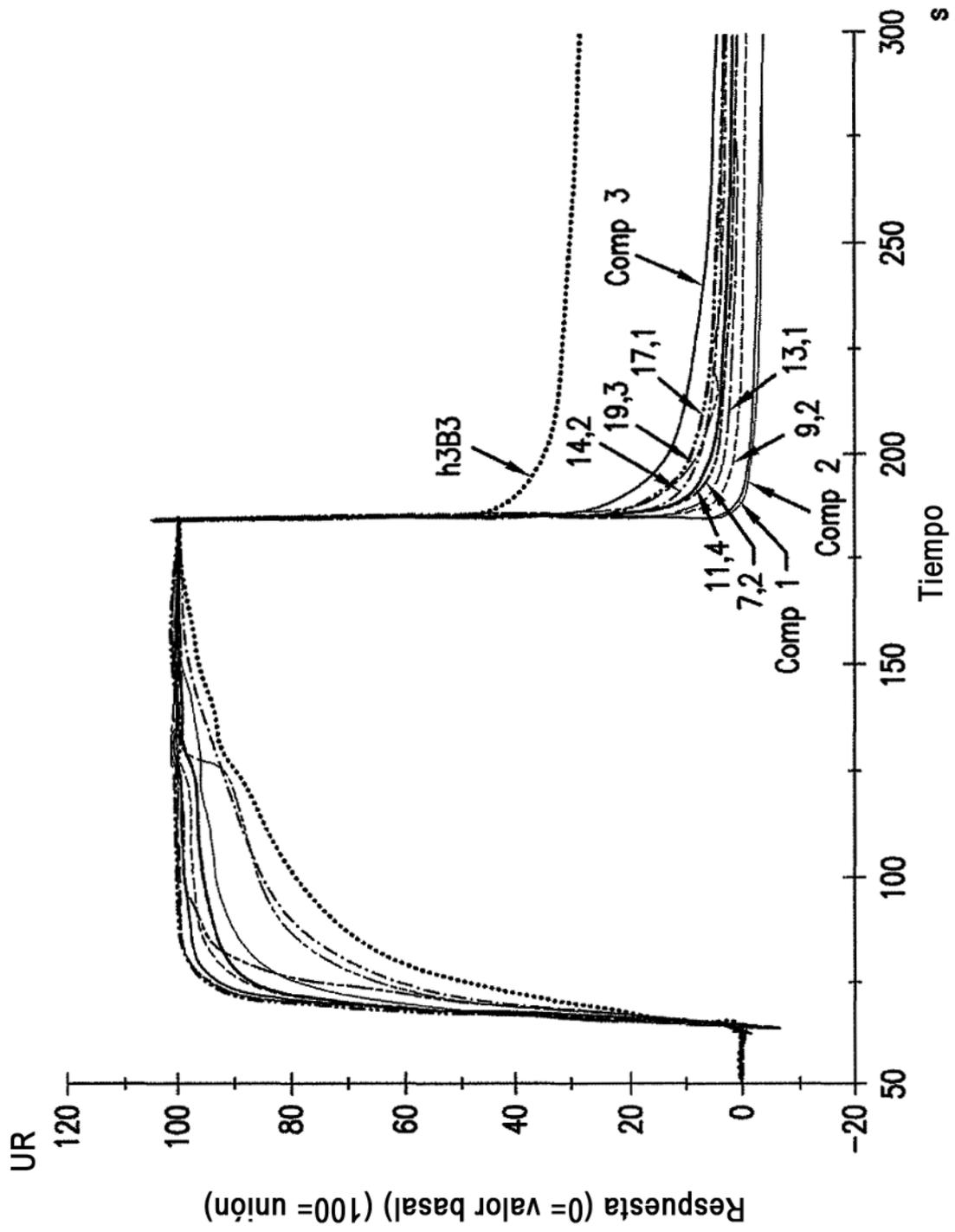


FIG.5

```

19.3_vh
humana_vh3-66
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAYISRGSSIIY
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS-----WVRQAPGKGLEWS-----
*****; : : . *****; : : :
: : . *****; **; *****; : : : . . . : : :

19.3_vh
humana_vh3-66
ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYVCARGITTALDYWGQGLVTVSS
-----RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR-----
: : . *****; **; *****; : : : . . . : : :

19.3_v1
humana_vk2-19
DVVMTQPSLSPVTPGEPASISCRSSQSIHNSGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASNRF
DIVMTQPSLSPVTPGEPASIS-----WYLQKPGQSPQLLIY-----
*. *****; : : : . . . : : : *****; : : :

19.3_v1
humana_vk2-19
SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSRLGPSFGQGTKLEIL
-GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC-----
: *****; : : : . . . : : :

```

FIG.6A

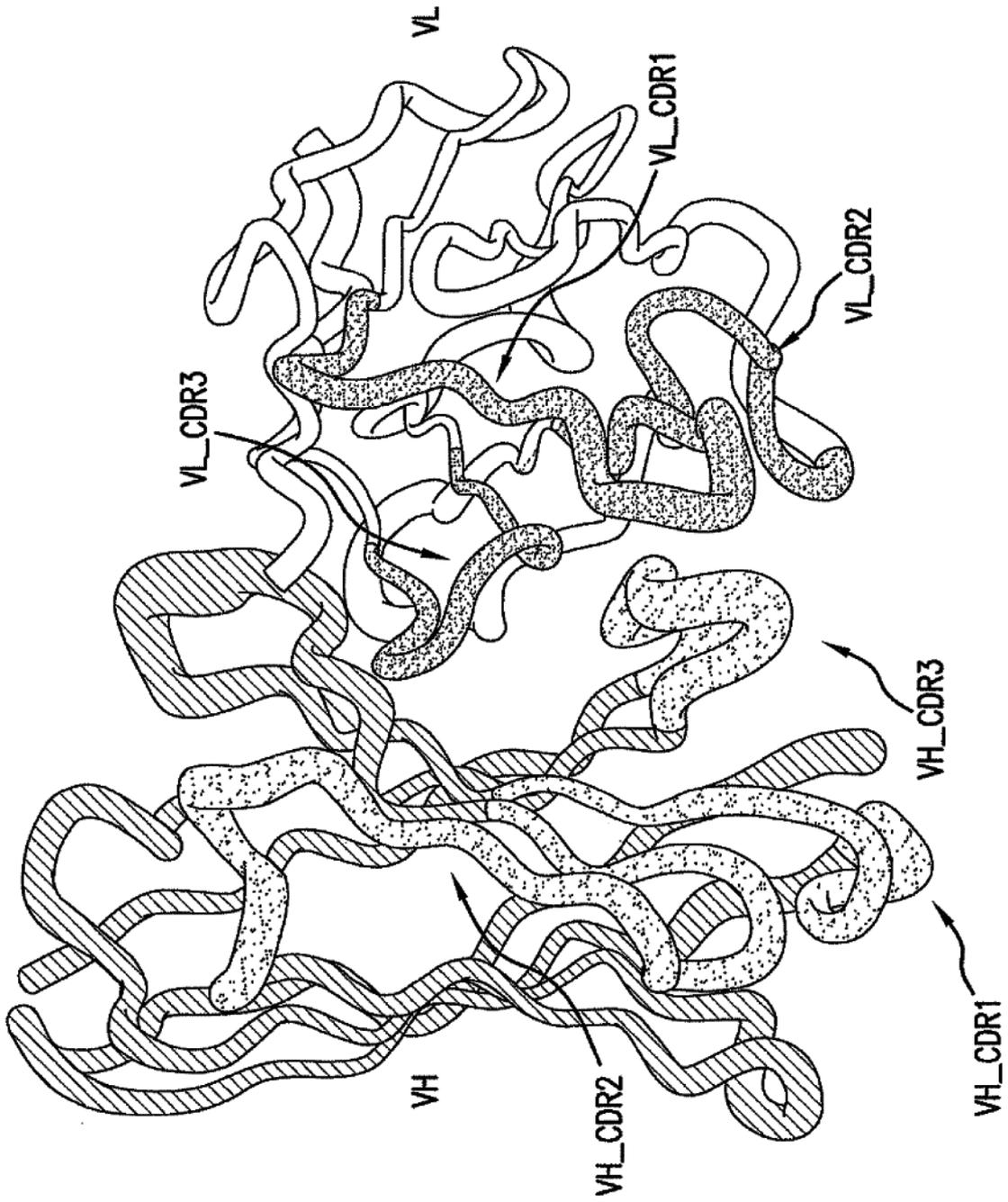


FIG.6B

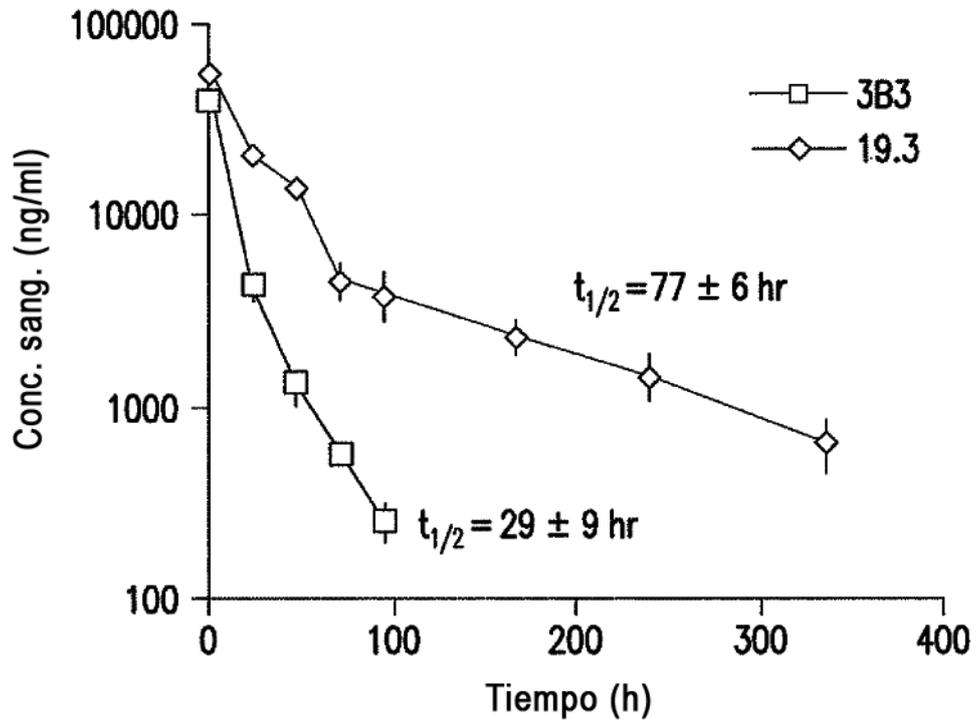


FIG.7

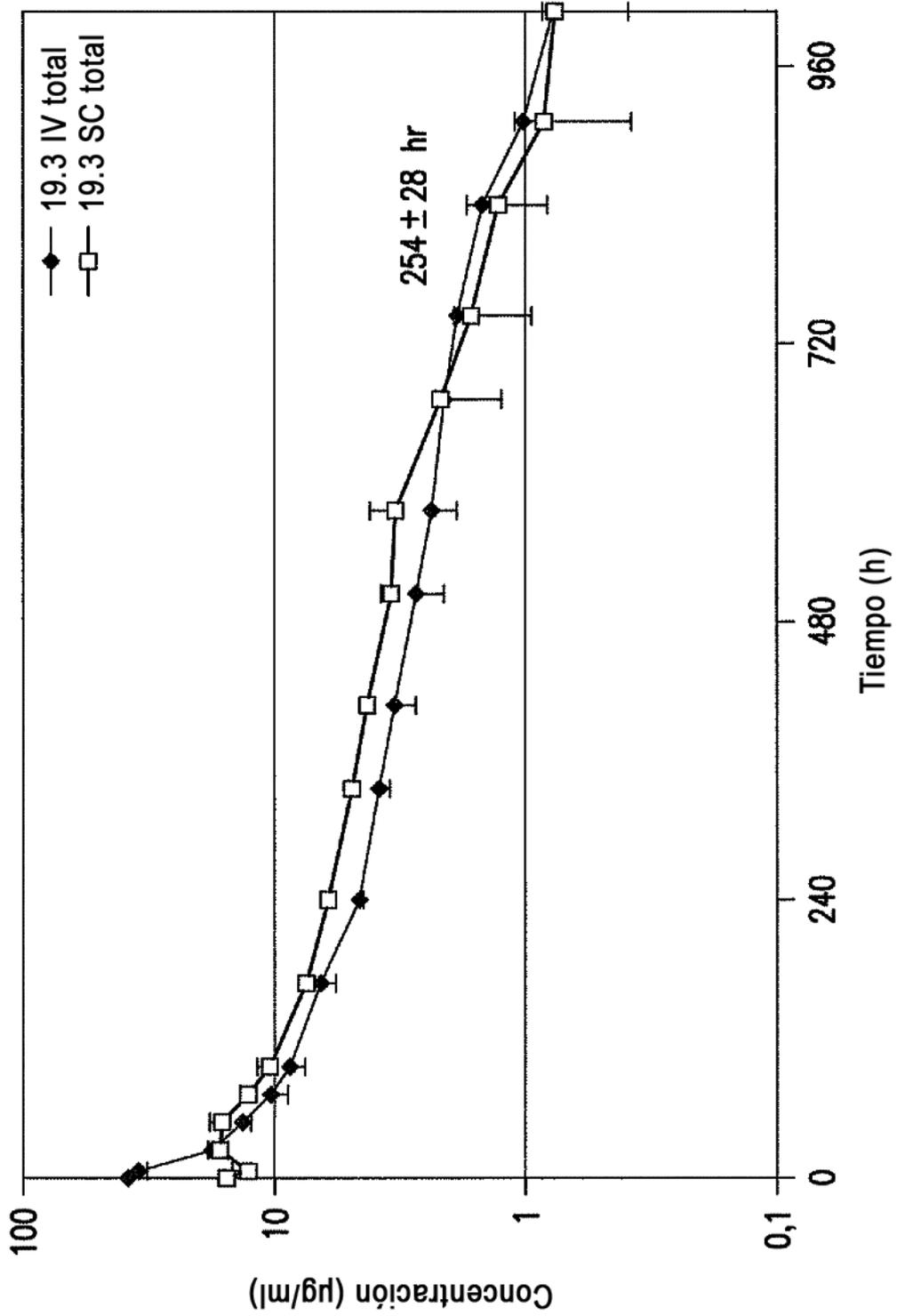


FIG.8

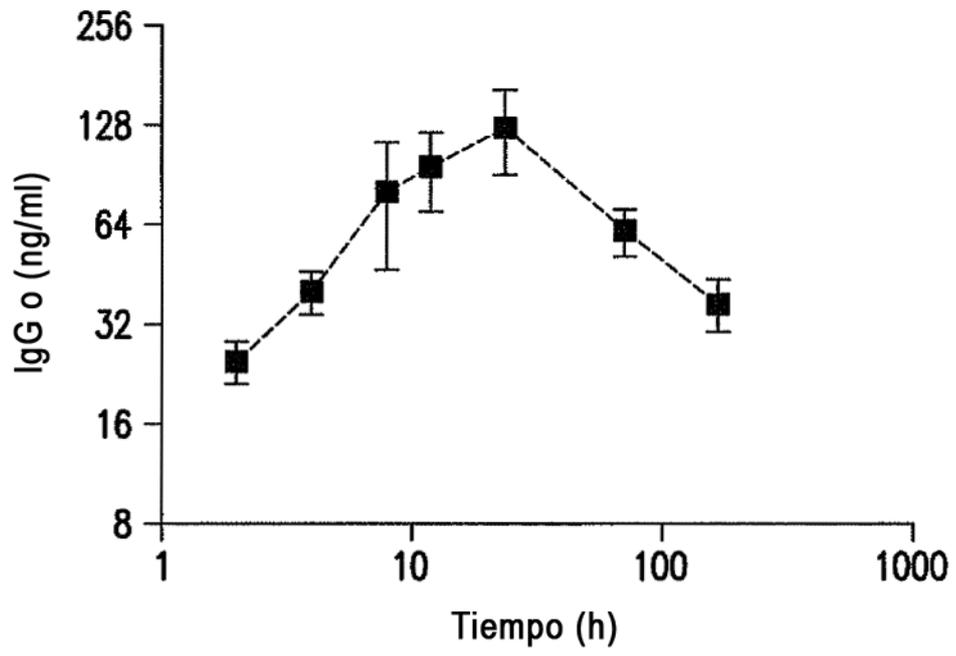


FIG.9

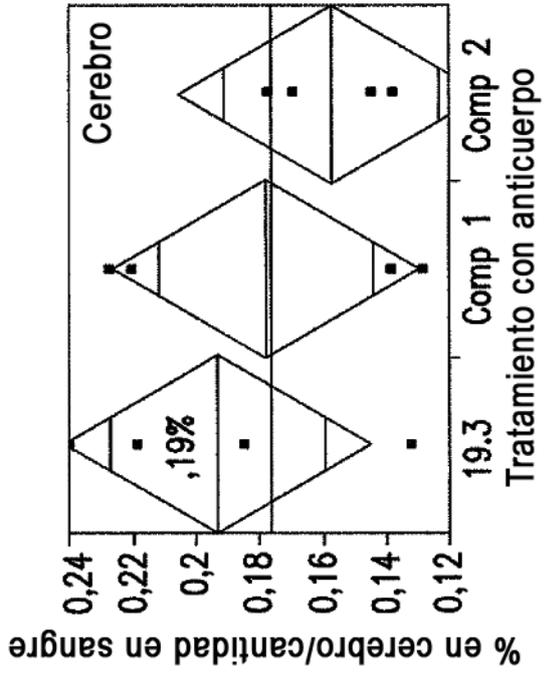


FIG. 10A

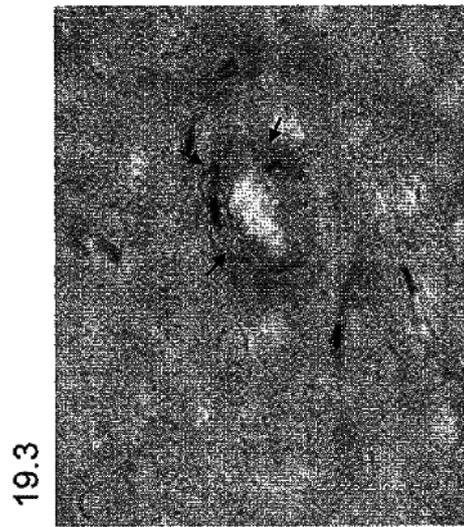


FIG. 10C

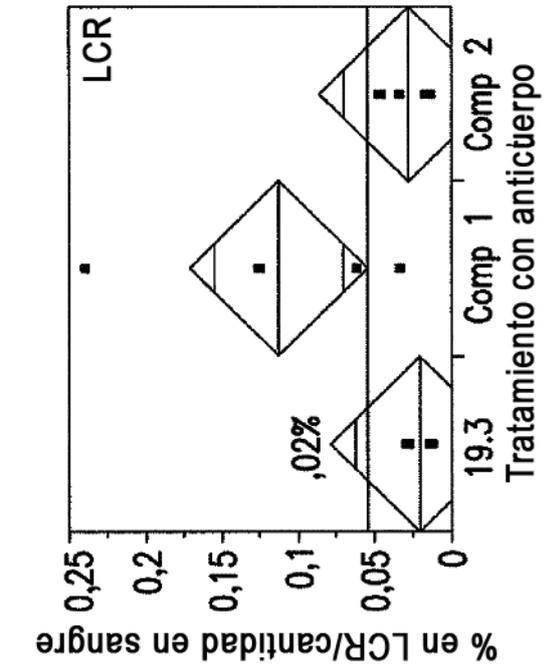


FIG. 10B

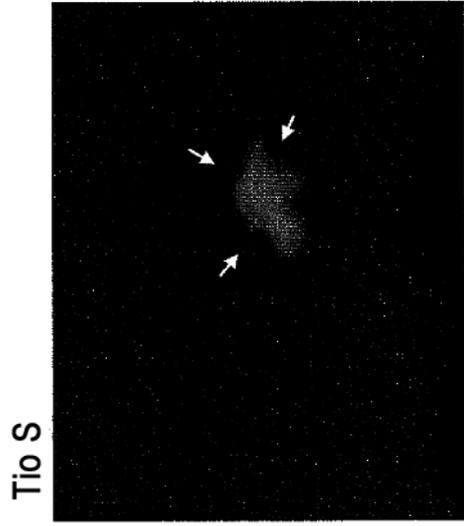


FIG. 10D

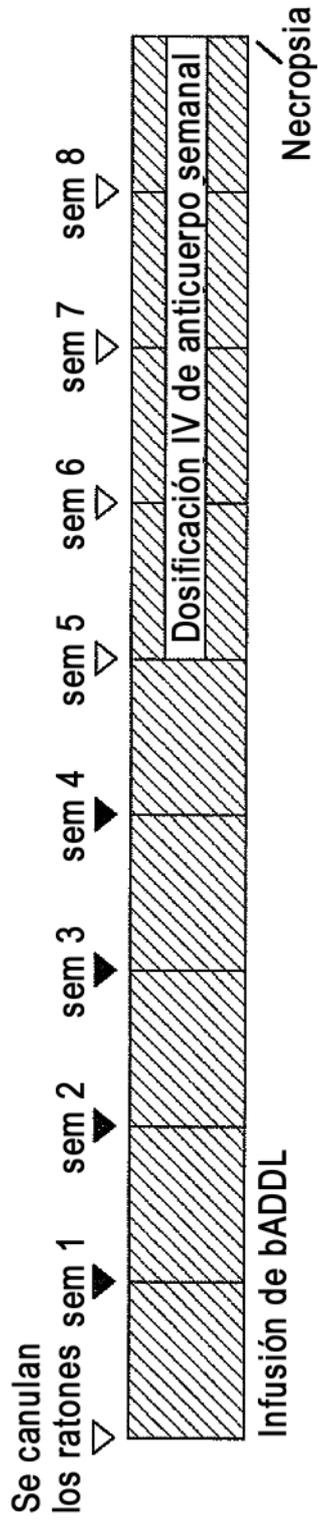


FIG.11A

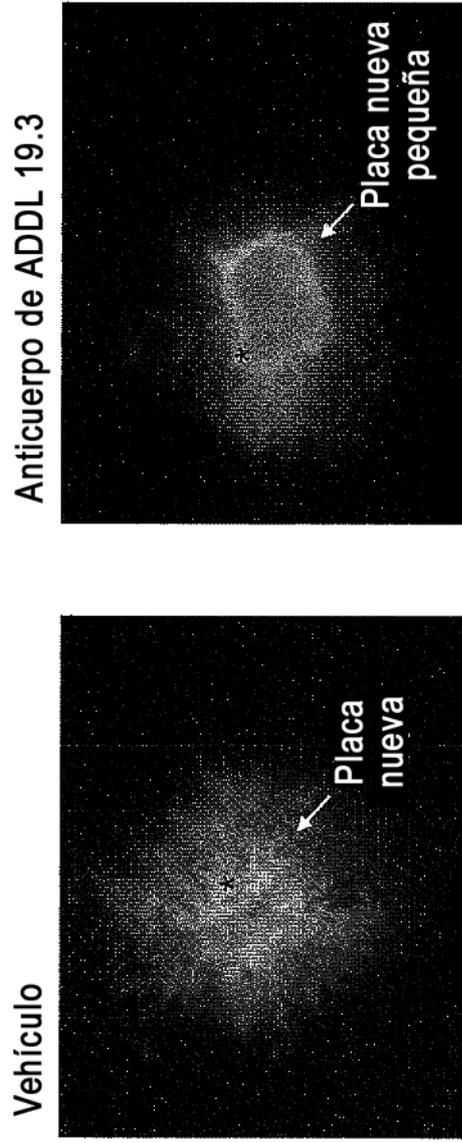


FIG.11B

FIG.11C