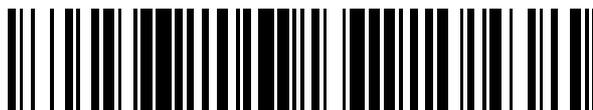


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 718**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (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: **08.05.2009 E 09159779 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2116556**

54 Título: **Anticuerpos contra el receptor de los productos finales de la glicación avanzada (RAGE) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.05.2008 US 51863 P

01.09.2008 US 93416 P

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

18.07.2016

73 Titular/es:

ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG (50.0%)

Max-Planck-Ring 2a

65205 Wiesbaden, DE y

ABBVIE INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

GU, JIJIE;

HSIEH, CHUNG-MING;

WU, ZHEN;

DIGIAMMARINO, ENRICO L.;

LUO, FENG;

FOX, GERARD B.;

HARLAN, JOHN E.;

SCHMIDT, MARTIN;

LOEBBERT, RALF;

MUELLER, REINHOLD;

EBERT, ULRICH y

NIMMIRICH, VOLKER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 577 718 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el receptor de los productos finales de la glicación avanzada (RAGE) y usos de los mismos

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente solicitud se refiere a anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, y en particular versiones humanizadas injertadas en CDR de los mismos, que pueden utilizarse en el tratamiento y la diagnosis de la Enfermedad de Alzheimer (AD), degeneración de las células del sistema nervioso central, aprendizaje y memoria deteriorados, transporte anormal de amiloide β y otras condiciones neuroinflamatorias asociadas con el Receptor de los Productos Finales de la Glicación Avanzada (RAGE). En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos que se fijan a RAGE.

INFORMACIÓN DE ANTECEDENTES

15 La Enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más frecuente de demencia entre los ancianos, con una incidencia de aproximadamente 10% de la población en aquéllos que tienen más de 65 años. Con la edad creciente, la probabilidad de enfermedad aumenta también. Globalmente, existen alrededor de 15 millones de personas afectadas con la enfermedad y se espera que los aumentos adicionales en la esperanza de vida acrecienten el número de personas afectadas con la enfermedad hasta aproximadamente el triple a lo largo de los próximas décadas. Teniendo en cuenta lo que antecede, existe una necesidad enorme e inmediata de tratamiento para la AD. Con dicho tratamiento, los pacientes afectados pueden ser capaces de mantener un estilo de vida funcional y activo durante muchos años más allá de lo que es posible sin dicho tratamiento. Así pues, no sólo existen implicaciones financieras para dicho tratamiento, sino también indicaciones de "calidad de vida", para los pacientes así como para sus cuidadores.

25 Desde un punto de vista molecular, la AD se caracteriza por un depósito de proteínas agregadas anormalmente. En el caso de las placas de amiloide extracelulares, estos depósitos consisten fundamentalmente en filamentos del péptido amiloide- β ($A\beta$), y en el caso de las madejas neurofibrilares intracelulares (NFTs), mayoritariamente en la proteína tau. La AD se caracteriza también por una expresión neuronal incrementada de RAGE. RAGE es un receptor multi-ligando de la familia de las inmunoglobulinas que funciona como un aceptor de la superficie celular transductor de señales para $A\beta$.

35 Ha sido demostrado por varios grupos que la infusión de $A\beta$ 40 en ratones conduce a vasoconstricción de los vasos cerebrales y disminución del flujo sanguíneo cerebral (CBF). Los pacientes que sufren AD tienen también un flujo sanguíneo cerebral disminuido. En los modelos de AD de ratón en los que los animales transgénicos sobreexpresan la proteína Precursora de Amiloide (APP) que conduce a la enfermedad causante de la formación de placas, RAGE ha sido implicado como factor patógeno en la progresión de la enfermedad (Deane et al. Nature Medicine 9(7) pp 907-913, 2003; Arancio et al. EMBOJ, 1-10, 2004).

40 Se ha demostrado que RAGE se fija a los péptidos $A\beta$. La inhibición de esta interacción suprime la acumulación de $A\beta$ en el modelo de animales transgénicos; por esta razón, se cree que RAGE está implicado en AD. Se ha demostrado que el tratamiento con sRAGE (RAGE soluble) así como anticuerpos anti-RAGE reduce los números de placas (Deane et al, 2003). El bloqueo de la interacción de RAGE con amiloide por anticuerpos podría llegar a ser un

tratamiento para los pacientes de AD; sin embargo, los anticuerpos policlonales existentes generados a partir de suero de animales no son adecuados para el tratamiento crónico de los humanos:

5 La interacción de RAGE con A β se describe en WO 2006/077101 A1, que describe la competición de RAGE que carece del dominio v para la fijación de A β a RAGE, así como la competición de péptidos que representan partes del dominio C terminal de RAGE, en su mayoría el dominio C1. La interacción de anticuerpos anti-RAGE con el dominio v de RAGE se describe en WO 2007109749 (A2); que describe también que la fijación de diferentes ligandos (S100b, HMGB1 (proteína High Mobility Group Box 1), amiloide a β) podría fijarse a RAGE por fijación a este dominio.

10 WO 2008/137552 A2 da a conocer ciertos anticuerpos monoclonales anti-RAGE que se fijan a diferentes dominios de RAGE. La mayoría de dichos anticuerpos inhiben la interacción de RAGE humano y un complejo de HMGB1 y CpG DNA.

15 WO 2006/077101 se refiere a la identificación, funcionalidad y uso de péptidos designados AGER-RME y AGER-CDP de RAGE. Dichos péptidos son aplicables, entre otras cosas, para identificación y preparación de ligandos de fijación de RAGE como anticuerpos anti-RAGE.

20 La presente invención describe nuevos anticuerpos monoclonales que se fijan a los dominios C de RAGE y la interacción y competición específicas con la fijación de A β con anticuerpos monoclonales para el dominio C1 y C2 en RAGE.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 La presente invención proporciona moléculas de fijación, en particular anticuerpos, que se fijan específicamente a RAGE; como se define en las reivindicaciones adjuntas; secuencias CDRs individuales de los mismos o secuencias CDR afines, como se especifica con mayor detalle más adelante.

30 Específicamente, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se fijan a RAGE, más específicamente anticuerpos monoclonales que se fijan al dominio C de RAGE.

35 Se describen en esta memoria anticuerpos anti-RAGE que se fijan específicamente a RAGE y comprenden una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90% a cualquiera de SEQ ID Nos.: 5, 13, y 21, o es un fragmento de fijación de RAGE de un anticuerpo comprendido en dichas secuencias.

40 Se describen también en esta memoria anticuerpos anti-RAGE que se fijan específicamente a RAGE y comprenden una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90% a cualquiera de SEQ ID Nos.: 1, 9, y 17, o es un fragmento de fijación de RAGE de un anticuerpo comprendido en dichas secuencias.

En particular, se describen en esta memoria varios anticuerpos monoclonales que son capaces de fijarse al dominio C de RAGE, y bloquear la fijación de los globulómeros A β . Más específicamente, la presente invención describe el

anticuerpo monoclonal 11 E6, que se fija al dominio C-2 de RAGE, no se fija a péptidos con secuencias de aminoácidos utilizadas para generar anticuerpos policlonales, y es capaz de *neutralizar in vivo* el efecto de A β 1-40 en la vasculatura cerebral de los ratones.

- 5 Los anticuerpos anti-RAGE de la invención incluyen anticuerpos que se fijan específicamente al dominio C de RAGE.

Los anticuerpos anti-RAGE de la invención incluyen un anticuerpo anti-RAGE o un fragmento de fijación de RAGE como se ha descrito arriba, que se selecciona del grupo constituido por anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado
10 en CDR o humanizado, un anticuerpo de cadena simple, una proteína de fusión, y un anticuerpo humano.

En diversas realizaciones, los anticuerpos de la invención son anticuerpos recombinantes o anticuerpos monoclonales. A los anticuerpos neutralizantes particulares que se describen en esta memoria se hace referencia aquí como mAb7F9, mAb11E6, y mAb4E5 y fragmentos de anticuerpo funcionales de los mismos, y otros
15 anticuerpos y fragmentos de anticuerpo funcionales con propiedades equivalentes a mAb7F9, mAb11E6, y mAb4E5, tales como fijación con afinidad alta a RAGE con cinética de disociación baja y capacidad de neutralización alta se consideran como parte de la presente invención. Los anticuerpos humanos de la presente solicitud, sin embargo, pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por el polipéptido RAGE inmunógeno de las inmunoglobulinas de la línea germinal humana o fragmento del mismo, lo que puede determinarse por cualquier
20 método conocido en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de fijación puede medirse por tecnología competitiva ELISAs, c RIAs, BIAcore o KinExA. La tasa de disociación puede medirse también por tecnología BIAcore o KinExA. La afinidad de fijación y la tasa de disociación se miden por resonancia de plasmones de superficie utilizado, v.g., BIAcore.

- 25 Uno de los anticuerpos monoclonales que se describen en esta memoria, el anticuerpo mAb7F9, tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1; y SEQ ID NOs. 2, 3, y 4 que son los residuos 31-35, 50-68, y 101-108 de SEQ ID NO: 1, respectivamente. El anticuerpo mAb7F9 tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera (región VL)
30 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, y SEQ ID NOs. 6, 7, 8 que son los residuos 24-34, 50-56, y 89-97 de SEQ ID NO: 5, respectivamente.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención, el anticuerpo mAb11E tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH)
35 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9; y SEQ ID NOs. 10, 11, y 12 que son los residuos 31-35, 50-66, y 99-109 de SEQ ID NO: 9, respectivamente, y en los cuales al menos una de las tres CDRs está modificada como se define en las reivindicaciones. El anticuerpo mAb11E6 de la presente invención tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13, y SEQ ID NOs: 14, 15, y 16 que son los residuos 24-34, 50-56, 89-97
40 de SEQ ID NO: 13, respectivamente, y en los cuales al menos una de las tres CDRs está modificada como se define en las reivindicaciones. El mAb 11 E6 se fija al dominio C-2 de RAGE, no se fija a péptidos con secuencias de aminoácidos utilizadas para generar anticuerpos policlonales, y es capaz de *neutralizar in vivo* el efecto de A β 1-40 sobre la vasculatura cerebral en los ratones.

Otro de los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria, el anticuerpo mAb4E5, tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17; y SEQ ID NOs: 18, 19, y 20 que son los residuos 31-35, 50-66, y 99-109 de SEQ ID NO: 17, respectivamente. El anticuerpo mAb4E5 de la presente invención tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21, y SEQ ID NOs: 22, 23, y 24 que son los residuos 24-34, 51-56, 89-97 de SEQ ID NO: 21, respectivamente.

Se entenderá también que los anticuerpos monoclonales aislados que interaccionan con RAGE de la presente solicitud pueden ser una proteína de fijación glicosilada en la que el anticuerpo o la porción de fijación de antígeno del mismo comprenden uno o más residuos carbohidrato. La producción de proteínas nacientes *in vivo* puede sufrir procesamiento ulterior, conocido como modificación post-traducciona. En particular, pueden añadirse residuos azúcar (glicosilo) enzimáticamente, proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales de oligosacárido unidas covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula hospedadora en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (v.g., glicosil-transferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteínas, y la composición de los residuos glicosilo, pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se exprese la proteína particular. Residuos glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero sin carácter limitante, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico.

Los anticuerpos de la presente solicitud comprenden una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Adicionalmente, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. En particular, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena simple. Reemplazamientos de residuos de aminoácido en la porción Fc que alteran la función efectora del anticuerpo se conocen en la técnica (Winter, et al. Patentes U.S. Nos. 5,648,260; 5,624,821). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes, v.g. inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y semivida/tasa de aclaramiento del anticuerpo y los complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para anticuerpos terapéuticos, pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso deletéreas, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos IgG humanos, particularmente IgG1 e IgG3 median ADCC y CDC por fijación a Fcγ Rs y C1q del complemento, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la semivida circulante de los anticuerpos. En otra realización adicional, al menos un residuo de aminoácido está reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo la región Fc del anticuerpo, de tal manera que las funciones efectoras de anticuerpo se alteran.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A-1C muestran la fijación ELISA de los anticuerpos monoclonales anti-humanos RAGE recombinantes y derivados de hibridoma 7F9, 11E6, y 4E5 a RAGE recombinante humano.

La figura 2 muestra la caracterización de los anticuerpos monoclonales 7F9, 11E6, y 4E5 por fijación de transferencia de punto.

5 Las figuras 3A-3C muestran resultados del ensayo HTRF que presentan la competición sRAGE - globulómeros A β -anticuerpos monoclonales.

La figura 4 muestra la fijación HTRF sRAGE – globulómero A β .

10 La figura 5 muestra la fijación de globulómeros A β a sRAGE-Fc y al dominio v de RAGE.

Las figuras 6A-6C muestran experimentos de fijación ELISA de anticuerpos monoclonales de la invención a diferentes fragmentos RAGE.

15 Las figuras 7A-7C muestran experimentos de fijación ELISA de anticuerpos monoclonales de la invención a diferentes fragmentos RAGE.

Las figuras 8a-8f muestran cambios de Flujo Sanguíneo Cerebral inducidos por diferentes dosis de A β 1-40.

20 Las figuras 9A-9C muestran efectos de 11 E6 en cambios inducidos por A β 1-40 En el Flujo Sanguíneo Cerebral.

Las figuras 10 muestran cambios de Flujo Sanguíneo Cerebral observados en ratones EG 2576 viejos tratados con diferentes dosis de 11 E6 o anticuerpo de control.

25 La figura 11 muestra que el anticuerpo 11 E6 protege las neuronas del hipocampo contra la escisión dinámica inducida por A β . Panel superior: Se presentan muestras representativas de condiciones experimentales repetidas procedentes de un solo experimento y se indican arriba las concentraciones de tratamiento (en μ M). Las células sin adición de A β exhiben señales predominantemente intactas (- 100 kDa)_de dinamin-I (primera barra), que se reduce y vuelve a un producto de escisión de ~90 kilodaltons en células tratadas con A A β 5 micromolar (segunda barra). El tratamiento con anticuerpo 11 E6 (3ª barra) previene la escisión, mientras que un anticuerpo de control IG1 hay partes 4ª barra) carece de efecto protector acusado. Panel inferior: la cuantificación de la señal de dinamin-de 3 experimentos independientes (expresada como % de dinamin +/- SEM después de normalización a tratamiento con 0 micromolar A A β) reveló un efecto protector estadísticamente significativo de 11 E6 (A NOVA de una vía, test de Kruskal Wallis seguido por test de Dunns; [†] indica p <0,05).

30

35

La figura 12 muestra la influencia de 11E6 (A) o anticuerpo de control (B) sobre la supresión fuerte inducida por globulómero de la transmisión sináptica en un cultivo de cortes de hipocampo de rata. 11 E6 01 micromolar invertían completamente los déficits inducidos por el globulómeros (véase paréntesis (A)).

40 La figura 13 muestra el efecto de un tratamiento de 12 semanas con anticuerpo 11 E6 sobre los depósitos de placa de Amiloide en ratones TG 2576. Se representa el área cubierta con placas (A, B) y el número de placas (C, D) como se detecta por marcación con el anticuerpo 6G1 anti-A β después de tratamiento con

5 anticuerpo de control 11 E6 o IgG1 (n = 19/grupo). El tratamiento con 11 E6 reducía el área cubierta por y el número de depósitos en el neocórtex en un 24,5% (A) y 26,8% (C), respectivamente. El análisis estadístico revelaba una tendencia acusada (asteriscos entre paréntesis, p <0,06; test U de Mann-Whitney). La reducción era estadísticamente significativa en el córtex frontal (asteriscos, p <0,05; test U de Mann-Whitney) donde el área de los depósitos se reducía en un 23,5% (B) y su número en un 26,8% (D) después del tratamiento con 11E6.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 SEQ ID NO: 1: secuencia de aminoácidos de mAb VH 7F9
- SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos de mAb VH 7F9 CDR-H1
- SEQ ID NO: 3: secuencia de aminoácidos de mAb VH 7F9 CDR-H2
- SEQ ID NO: 4: secuencia de aminoácidos de mAb VH 7F9 CDR-H3
- SEQ ID NO: 5: secuencia de aminoácidos de mAb VL 7F9
- 15 SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de mAb VL 7F9 CDR-L1
- SEQ ID NO: 7: secuencia de aminoácidos de mAb VL 7F9 CDR-L2
- SEQ ID NO: 8: secuencia de aminoácidos de mAb VL 7F9 CDR-L3
- SEQ ID NO: 9: secuencia de aminoácidos de mAb VH 11E6
- SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácidos de mAb VH 11E6 CDR-H1
- 20 SEQ ID NO: 11: secuencia de aminoácidos de mAb VH 11E6 CDR-H2
- SEQ ID NO: 12: secuencia de aminoácidos de mAb VH 11E6 CDR-H3
- SEQ ID NO: 13: secuencia de aminoácidos de mAb VL 11E6
- SEQ ID NO: 14: secuencia de aminoácidos de mAb VL 11E6 CDR-L1
- SEQ ID NO: 15: secuencia de aminoácidos de mAb VL 11E6 CDR-L2
- 25 SEQ ID NO: 16: secuencia de aminoácidos de mAb VL 11E6 CDR-L3
- SEQ ID NO: 17: secuencia de aminoácidos de mAb VH 4E5
- SEQ ID NO: 18: secuencia de aminoácidos de mAb VH 4E5 CDR-H1
- SEQ ID NO: 19: secuencia de aminoácidos de mAb VH 4E5 CDR-H2
- SEQ ID NO: 20: secuencia de aminoácidos de mAb VH 4E5 CDR-H3
- 30 SEQ ID NO: 21: secuencia de aminoácidos de mAb VL 4E5
- SEQ ID NO: 22: secuencia de aminoácidos de mAb VL 4E5 CDR-L1
- SEQ ID NO: 23: secuencia de aminoácidos de mAb VL 4E5 CDR-L2
- SEQ ID NO: 24: secuencia de aminoácidos de mAb VL 4E5 CDR-L3
- SEQ ID NO: 25: secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de Ig gamma \square \square 1
- 35 humana
- SEQ ID NO: 26: secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de Ig kappa humana
- SEQ ID NO: 27: secuencia de nucleótidos completa del plásmido Constructo #1 (negrilla) que codifica OmpA-[RAGE (23-340)]-6HIS
- SEQ ID NO: 28: secuencia de nucleótidos completa del plásmido Constructo # 2 (negrilla) que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (24-129)]
- 40 SEQ ID NO: 29: secuencia de nucleótidos completa del plásmido Constructo # 3 (negrilla) que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (24-234)]

ES 2 577 718 T3

- SEQ ID NO: 30: secuencia de nucleótidos completa del plásmido Constructo # 4 (negrilla) que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (24-336)]
- SEQ ID NO: 31: secuencia de nucleótidos completa del plásmido Constructo # 5 (negrilla) que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (130-234)]
- 5 SEQ ID NO: 32: secuencia de nucleótidos completa del plásmido Constructo # 6 (negrilla) que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (130-336)]
- SEQ ID NO: 33: secuencia de nucleótidos completa del plásmido Constructo # 7 (negrilla) que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (235-336)]
- SEQ ID NO: 34: secuencia de aminoácidos de la proteína RAGE # 1
- 10 SEQ ID NO: 35: secuencia de aminoácidos de la proteína RAGE # 2
- SEQ ID NO: 36: secuencia de aminoácidos de la proteína RAGE # 3
- SEQ ID NO: 37: secuencia de aminoácidos de la proteína RAGE # 4
- SEQ ID NO: 38: secuencia de aminoácidos de la proteína RAGE # 5
- SEQ ID NO: 39: secuencia de aminoácidos de la proteína RAGE # 6
- 15 SEQ ID NO: 40: secuencia de aminoácidos de la proteína RAGE # 7
- SEQ ID NO: 41: secuencia de aminoácidos mutante de la región constante de Ig gamma-1
- SEQ ID NO: 42: secuencia de aminoácidos de la región constante de Ig gamma 2
- SEQ ID NO: 43: secuencia de aminoácidos marco VH7-4.1/JH6 FR1
- SEQ ID NO: 44: secuencia de aminoácidos marco VH7-4.1/JH6 FR2 y VH1-2/JH6 FR2
- 20 SEQ ID NO: 45: secuencia de aminoácidos marco VH7-4.1/JH6 FR3
- SEQ ID NO: 46: secuencia de aminoácidos marco VH7-4.1/JH6 FR4 y VH1-2/JH6 FR4
- SEQ ID NO: 47: secuencia de aminoácidos marco VH1-2/JH6 FR1
- SEQ ID NO: 48: secuencia de aminoácidos marco VH1-2/JH6 FR3
- SEQ ID NO: 49: secuencia de aminoácidos marco 1-12/L5/JK2 FR1
- 25 SEQ ID NO: 50: secuencia de aminoácidos marco 1-12/L5/JK2 FR2
- SEQ ID NO: 51: secuencia de aminoácidos marco 1-12/L5/JK2 FR3
- SEQ ID NO: 52: secuencia de aminoácidos marco 1-12/L5/JK2 FR4 y 3-15/L2/JK2 FR4
- SEQ ID NO: 53: secuencia de aminoácidos marco 3-15/L2/JK2 FR1
- SEQ ID NO: 54: secuencia de aminoácidos marco 3-15/L2/JK2 FR2
- 30 SEQ ID NO: 55: secuencia de aminoácidos marco 3-15/L2/JK2 FR3
- SEQ ID NO: 56: Secuencia de aminoácidos injertada en VH 11E6.1-GL
- SEQ ID NO: 57: Secuencia de aminoácidos injertada en VH 11E6.2-GL
- SEQ ID NO: 58: Secuencia de aminoácidos injertada en VL 11E6.1-GL
- SEQ ID NO: 59: Secuencia de aminoácidos injertada en VL 11E6.2-GL
- 35 SEQ ID NO: 60: secuencia de aminoácidos de hRAGE
- SEQ ID NO: 61: secuencia de aminoácidos de un fragmento husRAGE
- SEQ ID NO: 62: secuencia de aminoácidos humanizada VH h11E6.1
- SEQ ID NO: 63: secuencia de aminoácidos humanizada VL h11E6.1
- SEQ ID NO: 64: secuencia de aminoácidos humanizada VL h11E6.2
- 40 SEQ ID NO: 65: secuencia de aminoácidos humanizada VL h11E6.3
- SEQ ID NO: 66: secuencia de aminoácidos humanizada VL h11E6.4
- SEQ ID NO: 67: secuencia de aminoácidos humanizada VH h11E6.5
- SEQ ID NO: 68: secuencia de aminoácidos humanizada VH h11E6.9

- SEQ ID NO: 69: secuencia de aminoácidos humanizada VH h11E6.16
 SEQ ID NO: 70: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE NtermR31
 SEQ ID NO: 71: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 1
 SEQ ID NO: 72: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 2
 5 SEQ ID NO: 73: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 3
 SEQ ID NO: 74: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 4
 SEQ ID NO: 75: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 5
 SEQ ID NO: 76: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 6
 SEQ ID NO: 77: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 7
 10 SEQ ID NO: 78: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 8
 SEQ ID NO: 79: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 9
 SEQ ID NO: 80: secuencia de aminoácidos del péptido derivado de RAGE 10
 SEQ ID NO: 81: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 82: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 15 SEQ ID NO: 83: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 84: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 85: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 86: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 87: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 20 SEQ ID NO: 88: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 89: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 90: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 91: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 92: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 25 SEQ ID NO: 93: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
 SEQ ID NO: 94: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Definiciones generales

A no ser que se defina otra cosa en esta memoria, los términos científicos y técnicos en conexión con la presente invención tendrán los significados que son entendidos comúnmente por quienes poseen la experiencia ordinaria en la técnica. Debe quedar claro, sin embargo, que en el supuesto de cualquier ambigüedad latente, las definiciones
 35 proporcionadas en esta memoria prevalecerán sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca en cuanto al significado y alcance de los términos. Adicionalmente, a no ser que el contexto requiera otra cosa, los términos singulares cubrirán los plurales y los términos plurales incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/ o" a no ser que se indique otra cosa. Además, el uso del término "con inclusión", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido" no es limitante. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componentes" abarca
 40 ambos elementos y componentes que comprenden 1 U y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a no ser que se exponga específicamente otra cosa.

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en esta memoria, son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente conforme a métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y exponen a lo largo de la presente memoria descriptiva a no ser que se indique otra cosa. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan conforme a especificaciones del fabricante, tal como se realizan comúnmente en la técnica o como se describe en esta memoria. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y los procedimientos técnicos de laboratorio de, química analítica, química orgánica de síntesis, y química médica y farmacéutica descritas en esta memoria son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formación y el suministro, así como para el tratamiento de los pacientes, se utilizan técnicas estándar.

Con objeto de que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, se definen a continuación términos seleccionados.

El término "polipéptido", como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier cadena polímera de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se utilizan de modo intercambiable con el término polipéptido y se refieren también a una cadena polímera de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas naturales o artificiales, fragmentos de proteína y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monómero o polímero.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociada/o con componentes asociados naturalmente que lo acompañan en su estado natural; está especialmente exento/a de otras proteínas de la misma especie; es expresado/a por una célula de una especie diferente; o no existe en la naturaleza. Así, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína puede volverse también especialmente exenta de componentes asociados naturalmente por aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

El término "recuperación" como se utiliza en esta memoria, se refiere al proceso de convertir una especie química tal como un polipéptido sustancialmente exento de componentes asociados naturalmente por aislamiento, v.g., utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

El término "Receptor de los Productos Finales de LA Glicación Avanzada (RAGE)" designa un receptor multiligando en la familia de las inmunoglobulinas, que se fija al péptido A β soluble, S 100 b, y HMGB1 (conocido también como anfoterina) entre otros. RAGE media cambios celulares pato-fisiológicamente relevantes en respuesta a la fijación a estos ligandos. Los animales transgénicos que sobreexpresan RAGE y APP humana exhiben anomalías tempranas en el aprendizaje espacial y la memoria, indicativas de que RAGE es un cofactor para la perturbación neuronal inducida por A β en las patologías de tipo Alzheimer, y que sugiere que RAGE es una diana terapéutica potencial para mejorar la disfunción celular.

La estructura de RAGE no ha sido resuelta la homología con otras proteínas conduce a un modelo en el que RAGE tiene varios dominios. Estos dominios se nombran en analogía a las inmunoglobulinas: (i) dominio tipo V en el término N: este dominio equivalente en las inmunoglobulinas fija el antígeno y representa la única región de fijación en estas proteínas. En RAGE, este dominio se fija a algunos ligandos como S 100 (Ostendorp et al. EMBOJ. 26,3875,2007; Leclerc et al. JBC 282,31317,2007). Un anticuerpo monoclonal que se fija al dominio semejante a v en RAGE compite con la fijación de diferentes ligandos S100b, HMGB1, y Amiloide β (WO 2007 10 97 49 (A2)), indicando que estos ligandos podrían fijarse también a RAGE por la vía de este mismo dominio. (ii) Primer dominio semejante a C2: Dos dominios dentro de RAGE tienen homología con los dominios C2 de las inmunoglobulinas; uno de estos dominios ha sido denominado C1 (nomenclatura utilizada también por Ostendorp et al. BBRC 2006). Se han descrito varios ligandos de fijación a este dominio, por ejemplo, S 100 A 12 (denominado también ENRAGE o Calgranulina C), que se fija con una afinidad de $K_d = 90$ nM (Hofmann et al. Cell 97, 889, 1999; Xie et al. JBC, 282, 4218, 2007)³. A β compite con S 100 A 12 por este dominio, lo que sugiere que A β se fija también al dominio C1. (iii) Segundo dominio semejante a C2: este dominio se conoce como C2 (utilizado también por Ostendorp et al. BBRC 2006). El ligando S 100 A6 de RAGE se fija al dominio C2 y se demostró que un anticuerpo generado contra un péptido del dominio C2 compite contra S 100 A6 por esta fijación; el anticuerpo conduce a una transducción reducida de señales en SH-SY5Y (Leclerc et al. JBC 282, 31.317, 2007).

Un "dominio RAGE" pueden definirse en línea con las diferentes definiciones proporcionadas en la técnica anterior:

Conforme a Xie et al 7, J . Biol. Chem., Vol . 282:4218-4231 se aplica la definición siguiente de los dominios h RAGE:

- el dominio V (aminoácidos 24-129 de SEQ ID NO: 60),
- el dominio C1 (aminoácidos 130-234 de SEQ ID NO: 60),
- el dominio C2 (aminoácidos 235-336 de SEQ ID NO: 60).

conforme a una definición más reciente por Hudson et al, The FASEB Journal. 2008;22:1572-1580, h RAGE (404 residuos de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 60) tiene una región extracelular (aminoácidos 1-342 de SEQ ID NO: 60) compuesta de

- un péptido señal (aminoácidos 1-22 de SEQ ID NO: 60), seguido por tres dominios de tipo inmunoglobulina, que incluyen
- un dominio tipo V semejante a Ig (aminoácidos 23-116 de SEQ ID NO: 60) y
- dos dominios 1/2 tipo C2 semejantes a Ig (aminoácidos 124-221 de SEQ ID NO: 60; designado también dominio C1; y aminoácidos 227-317 de SEQ ID NO: 60; designado también dominio C2);
- un solo dominio transmembranal (aminoácidos 343-363 de SEQ ID NO: 60), y
- una cola citoplásmica corta (aminoácidos 364-404 de SEQ ID NO: 60).

Teniendo en cuenta el alto grado de identidad, en particular con respecto a la definición de los dominios V, C1 y C2, y a no ser que se indique otra cosa, cada una de las definiciones puede aplicarse a fin de definir las características de fijación de las proteínas de fijación de la presente invención.

Como se ha indicado arriba, RAGE es capaz de fijar diferentes ligandos por la vía de diferentes dominios. Los resultados de experimentos de competición con otros ligandos parecen indicar que A β se fija al dominio C1

(Hofmann et al. Cell 97, 889, 1999 o Xie et al. JBC, 282, 4218, 2007). Como ejemplos no limitantes de ligandos RAGE se pueden mencionar:

- 5 - Productos finales de la glicación avanzada (AGEs), (Baynes J.W., 1991, Diabetes. 1991, 40:405-412; Ahmed K.A., 2007, J Clin Biochem Nutr. 41 (2):97-105);
- Miembros de la familia S100/calgranulina (v.g., calgranulina C (conocida también como ENRAGE y S100A12), S100A1, S100A4, S100A11, S100A13, S100B, y S100P);
- Péptido Amiloide β ($A\beta$), como por ejemplo el péptido $A\beta$ 1-40;
- 10 - Globulómeros de amiloide- β ; como por ejemplo los globulómeros $A\beta$ 1-42, $A\beta$ 12-42, $A\beta$ 20-42 (véase Barghorn et al., Globular amyloid β peptide1-42 oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease) Journal of Neurochemistry 95(3):834-847, noviembre de 2005; WO2007/062852; WO2008/150949);
- integrinas leucocitarias (v.g., Mac-1).

15 El término "RAGE" como se utiliza en esta memoria, se refiere particularmente a RAGE humano, designado también "hRAGE" o "huRAGE". A no ser que se indique otra cosa, el término "RAGE" abarca también moléculas RAGE aisladas u obtenidas de otras especies diferentes de la humana, como por ejemplo, roedores, como ratones o ratas; o moléculas RAGE de ganado.

20 El término "sRAGE" se refiere a una forma soluble de RAGE, derivada del dominio extracelular de RAGE. Por ejemplo, una molécula de sRAGE derivada de RAGE humano, designada también como huRAGE, comprende los residuos de aminoácido 1 a 331 (véase SEQ ID NO: 61) de RAGE humano (véase SEQ ID NO: 60).

25 "Actividad biológica", como se utiliza en esta memoria, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de RAGE como se define en esta memoria.

30 Los términos "fijación específica" o "que se fijan específicamente", como se utilizan en esta memoria, con referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (v.g., un "determinante antigénico" o "epítipo" como se define más adelante) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo que reconoce y se fija a una estructura específica de proteína más bien que a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para un epítipo "A", la presencia de una molécula que contenga el epítipo A (o A el libre sin marcar), en una reacción que contenga "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado fijada al anticuerpo.

35 El término "anticuerpo", como se utiliza en esta memoria, se refiere en términos generales a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, 2 cadenas pesadas (H) y 2 cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento, mutante, valiente, o derivación funcional de la misma, que retenga las características esenciales de fijación del epítipo de una molécula Ig Formatos de anticuerpo mutantes, variantes, o derivados se conocen en la técnica. Decepciones no limitantes de los mismos se exponen más adelante. Un anticuerpo se dice
40 que es "capaz de fijarse" a una molécula si el mismo es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para unir con ello la molécula al anticuerpo.

Debe entenderse que un "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, que comparten una secuencia de aminoácidos de cadena pesada común y cadena ligera común, en contraste con las preparaciones de anticuerpos "policlonales" que contienen una mixtura de diferentes anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse por varias tecnologías nuevas como presentación de fago, bacterias, levadura o ribosoma así como métodos clásicos ilustrados por anticuerpos derivados de hibridoma (v.g., un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado por tecnología de hibridomas, tal como la metodología estándar del hibridoma de Kohler y Milstein ((1975) Nature 256:495-497).

En un anticuerpo de longitud total, cada cadena pesada está constituida por una región variable de cadena pesada (abreviada en esta memoria como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está constituida por 3 dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está constituida por una región variable de cadena ligera (abreviada en esta memoria como en LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está constituida por un solo dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse ulteriormente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, determinadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el término amino al término carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (v.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (v.g., IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG 4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "porción de fijación de antígeno" o "fragmento de fijación de antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se utiliza en esta memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de fijarse específicamente a un antígeno (v.g., RAGE). Se ha demostrado que la función de fijación de antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Tales realizaciones de anticuerpo pueden ser también formatos biespecíficos, de especificidad dual, o multispecíficos; que se fijan específicamente a dos o más antígenos diferentes. Ejemplos de fragmentos de fijación abarcados dentro del término "porción de fijación de antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd constituido por los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv constituido por los dominios VL y VH de una sola rama de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546, Winter et al., publicación PCT WO 90/05144 A1), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, los mismos pueden estar unidos, utilizando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que hace posible que los mismos se produzcan como una sola cadena de proteína en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase v.g., Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios deben considerarse también abarcados dentro del término "porción de fijación de antígeno" de un anticuerpo. Están abarcadas también otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL están expresados en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para hacer posible el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando con ello el apareamiento de los dominios con dominios de complementariedad de otra cadena y creando dos sitios de fijación de antígeno (véase v.g., Holliger, P., et al. (1993) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-

1123). Tales porciones de fijación de anticuerpos se conocen en la técnica (Kontermann y Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

5 El término "constructo de anticuerpo", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un polipéptido que comprende una o más de las porciones de fijación de antígeno de la invención unidas a un polipéptido enlazador o un dominio constante de inmunoglobulina. Polipéptidos enlazadores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para unir una o más de las porciones de fijación de antígeno. Tales polipéptidos - enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase, v.g., Holliger, P., et al. (1993) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina hace
10 referencia a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Secuencias de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de IgG humanas se conocen en la técnica y se representan en la Tabla 1.

15

20

25

30

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

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
Región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO.:25	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Mutante de Región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO.:41	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante de Ig gamma-2	SEQ ID NO.:42	ASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPS NTKVDKTVERRKCCVECPCCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSHPEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante de Ig kappa	SEQ ID NO.:26	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

Todavía más, un anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región de núcleo de estreptavidina para formar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para producir moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos enteros utilizando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Además, anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse utilizando técnicas estándar de DNA recombinante, como se describe en esta memoria.

Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tengan especificidades antigénicas diferentes (v.g., un anticuerpo aislado que se une específicamente a RAGE humano está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de RAGE humano). Un anticuerpo aislado que se fija específicamente a

RAGE humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas RAGE de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otros materiales y/o productos químicos celulares.

5 El término "anticuerpo humano", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (v.g., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o reacción específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y en particular CDR3. Sin embargo, el
 10 término "anticuerpo humano", como se utiliza en esta memoria, no pretende incluir anticuerpos en los cuales secuencias CDRs derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que incluye todos
 15 los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (lo que se describe adicionalmente más adelante), anticuerpos aislados de una librería de anticuerpos humanos recombinante combinatoria (Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., y
 20 Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (v.g., un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humanos (véase v.g., Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique remodelación de secuencias de genes de inmunoglobulina humanas a otras secuencias de
 25 DNA. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o bien, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan de y son afines a secuencias VH y VL de la línea
 30 germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadenas pesada y ligera de una especie y secuencias de región constante de otra especie, tales como anticuerpos
 35 que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas enlazadas a regiones constantes humanas. El anticuerpo quimérico puede producirse por técnicas recombinantes de biología molecular, o puede estar conjugado físicamente junto.

El término "anticuerpo injertado en CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie pero en los cuales las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL están reemplazadas con secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en las cuales una humana o más de las CDRs murinas (v.g., CDR3) ha sido reemplazada con secuencias CDR humanas.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "etiquetado Kabat" se utilizan intercambiamente en esta memoria. Estos términos, que están reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de los residuos de aminoácido que son más variables (es decir hipervariables) que otros residuos de aminoácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de fijación de antígeno de los mismos (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y Kabat, E.A., et al. (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable abarca desde las posiciones de aminoácido 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácido 50 a 65 para CDR2, y las posiciones de aminoácido 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable abarca desde las posiciones de aminoácido 24 a 34 para CDR 1, las posiciones aminoácido 50 a 56 para CDR2, y las posiciones de aminoácido 83 a 97 para CDR3.

Como se utiliza en esta memoria, los términos "acceptor" y "anticuerpo acceptor" se refieren al anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% ó 100% de las secuencias de aminoácido de una o más de las regiones marco. En algunas realizaciones, el término "acceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica la o las regiones constantes. En otra realización adicional, el término "acceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones marco y la o las regiones constantes. En una realización específica, el término "acceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo humano que proporciona o codifica al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80%, particularmente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% ó 100% de las secuencias de aminoácido de una o más de las regiones marco. Conforme a esta realización, un acceptor puede contener al menos 1, al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 residuos de aminoácido que no existe(n) en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región marco aceptora y/o región o regiones constantes aceptoras pueden derivarse u obtenerse v.g. a partir de un gen de anticuerpo de la línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (v.g., anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos el desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Como se utiliza en esta memoria, el término "CDR" se refiere a la región determinante de la complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpo. Existen tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR 1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto CDR" como se utiliza en esta memoria, se refiere a un grupo de tres CDRs que existen en una región variable simple capaz de fijarse al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs han sido definidos de modo diferente conforme a distintos sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) proporciona no sólo un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que proporciona también límites precisos de residuos que definen las tres CDRs. Estas CDRs pueden designarse como CDRs de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) encontraron que ciertas sub-porciones dentro de las CDRs de Kabat adoptan conformaciones de la cadena peptídica principal casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad al nivel de secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se designaron como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la "L" y la "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Puede hacerse referencia a estas regiones como CDRs de

Chothia, las cuales tienen límites que se solapan con las CDRs de Kabat. Otros límites que definen CDRs que se solapan con las CDRs de Kabat han sido descritos por Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Sin embargo, otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero no obstante se solaparán con las CDRs de Kabat, aunque pueden estar acortadas o
 5 alargadas teniendo en cuenta los hallazgos de predicción o experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDRs enteras no impactan significativamente en la fijación al antígeno. Los métodos utilizados en esta memoria pueden utilizar CDRs definidas conforme a cualquiera de estos sistemas, aunque realizaciones particulares utilizan CDRs definidas por Kabat o Chothia.

10 Como se utiliza en esta memoria, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o marco que define una estructura CDR canónica como se define por Chothia et al (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992)). Conforme a Chothia et al., porciones críticas de las CDRs de muchos anticuerpos tienen conformaciones de la cadena principal peptídica casi idénticas a pesar de gran diversidad al nivel de
 15 secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica fundamentalmente un conjunto de ángulos de torsión de la cadena peptídica principal para un segmento contiguo de residuos de aminoácido que forman un bucle.

Como se utilizan en esta memoria, los términos "donante" y "anticuerpo donante" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDRs. En una realización particular, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente que el anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones marco. En el contexto de un anticuerpo
 20 humanizado, el término "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDRs.

Como se utiliza en esta memoria, el término "marco" o "secuencia marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Dado que la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse por
 25 diferentes sistemas, el significado de una secuencia marco está sometido a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDRs (CDR-L1,-L2, y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2, y -H3 de cadena pesada) dividen también las regiones marco en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las cuales CDR1 está posicionada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR 2 y FR 3, y CDR3 entre FR
 30 3 y FR 4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR 2, FR 3 o FR 4, una región marco, como ha sido designada por otros, representa las FR's combinadas dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina simple existente naturalmente. Como se utiliza en esta memoria, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y FRs representa dos o más de las cuatro sub-regiones que constituya/n una región marco.

Secuenciasceptoras de cadena pesada y cadena ligera humanas se conocen en la técnica. En una realización de
 35 la invención, las secuenciasceptoras de cadena pesada y cadena ligera humana se seleccionan de las secuencias descritas en la Tabla 2 y la Tabla 3. Diferentes combinaciones para secuencias marco humanas FR1 a FR4 se indican en dichas Tablas.

40

Tabla 2: Secuenciasceptoras de cadena pesada humana

SEQ ID No.	Protein region	Sequence
		12345678901234567890123456789012
43	VH7-4.1/JH6 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT
44	VH7-4.1/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWVG
45	VH7-4.1/JH6 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR
46	VH7-4.1/JH6 FR4	WGQGTITVTVSS
47	VH1-2/JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
44	VH1-2/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWVG
48	VH1-2/JH6 FR3	RVTMTRDTSISITAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
46	VH1-2/JH6 FR4	WGQGTITVTVSS

Tabla 3: Secuenciasceptoras de cadena ligera humana

SEQ ID No.	Protein region	Sequence
		12345678901234567890123456789012
49	1-12/L5/JK2 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC
50	1-12/L5/JK2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
51	1-12/L5/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
52	1-12/L5/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
53	3-15/L2/JK2 FR1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC
54	3-15/L2/JK2 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
55	3-15/L2/JK2 FR3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYC
52	3-15/L2/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que conduce al reordenamiento genético y mutación para expresión de una inmunoglobulina particular. (Véase, v.g., Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-10 30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la presente invención parte del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen más probabilidad que los genes de anticuerpo maduros de conservar estructuras esenciales de secuencia de aminoácidos características de los individuos de la especie, y por tanto tienen menos probabilidad de ser reconocidas como procedentes de una fuente 15 extraña cuando se utilizan terapéuticamente en dicha especie.

Como se utiliza en esta memoria, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos en la región variable que tienen mayor impacto sobre la especificidad y/o afinidad de fijación de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero sin carácter limitante, uno o más de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de N- u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera, un residuo dentro de la zona Vernier, y un residuo en la región que se solapa entre la definición de Chothia de una CDR1 de cadena pesada variable y la definición de Kabat marco de la primera cadena pesada.

5 El término "anticuerpo humanizado" se refiere en general a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (v.g., un ratón), pero en los cuales al menos una porción de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más "afin al tipo humano", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado en CDR, en el cual se introducen secuencias CDR humanas en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes.

10

15

En particular, el término " anticuerpo humanizado" como se utiliza en esta memoria, un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se fija inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se utiliza en esta memoria, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80%, particularmente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Particularmente, un anticuerpo humanizado comprende también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene a la vez la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo puede incluir también las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene sólo una cadena ligera humanizada. En algunas ediciones, un anticuerpo humanizado contiene sólo una cadena pesada humanizada. En regiones específicas, un anticuerpo humanizado tiene sólo un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

20

25

30

35

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, con inclusión de IgY, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y pueden seleccionarse dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

40

Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no precisan corresponder exactamente a las secuencias parentales, v.g., la CDR del anticuerpo donante o el marco de consenso pueden estar mutagenizados por sustitución, inserción y/o deleción de al menos un residuo de aminoácido de tal modo que la CDR o residuo marco en dicho sitio no corresponde al anticuerpo donante o el marco de consenso. En una realización particular, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Usualmente, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80%, particularmente al menos 85%, más particularmente al menos 90%, y en particular al menos 95% de los residuos de anticuerpo humanizados corresponderán a los de las secuencias parentales FR y CDR. Como se utiliza en esta memoria, el término "marco de consenso" se refiere a la región marco en la secuencia de inmunoglobulinas de consenso. Como se utiliza en esta memoria, el término "secuencia de inmunoglobulinas de consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que existen con mayor frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulina afines (Véase v.g., Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido que aparece más frecuentemente en dicha posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con la misma frecuencia, pueden incluirse cualquiera de ellos en la secuencia de consenso.

Como se utiliza en esta memoria, la zona "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos marco que pueden ajustar la estructura CDR y sintonizar finamente el ajuste al antígeno como se describe por Foote and Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499). Los residuos de la zona Vernier forman una capa subyacente respecto a las CDRs y pueden impactar en la estructura de las CDRs y la afinidad del anticuerpo.

El término "inhibición de la fijación" de RAGE a uno de sus ligandos, como se utiliza en esta memoria, abarca una reducción parcial (como por ejemplo aproximadamente en 1 a 10% o más, en particular aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, o 95% o más) o completa de dicha actividad de fijación de ligandos. Dicha "inhibición de la fijación" puede determinarse por cualquier método adecuado disponible en la técnica, preferiblemente por cualquier método indicado en esta memoria, como por ejemplo los ensayos HTRF descritos en esta memoria.

Como se utiliza en esta memoria, el término "neutralizar" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de una proteína diana cuando una proteína de fijación se fija específicamente a la proteína diana. La neutralización puede ser el resultado de diferentes formas de fijación de dicha proteína de fijación a la diana. Por ejemplo, la neutralización puede estar causada por fijación de la proteína de fijación en una región de la diana, que no afecta a la fijación del receptor a la molécula diana. Alternativamente, la fijación de una proteína de fijación puede dar como resultado un bloqueo de la fijación del receptor a la diana, bloqueo que neutraliza finalmente la actividad de la proteína diana. Cada uno de dichos diferentes mecanismos puede ocurrir conforme a la invención.

En particular, una proteína de fijación neutralizante es un anticuerpo neutralizante cuya fijación a RAGE da como resultado la neutralización de una actividad biológica de RAGE. Particularmente, la proteína de fijación neutralizante se fija a RAGE y reduce una actividad biológica de RAGE al menos aproximadamente 1 a 10%, al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o más. La neutralización de una actividad biológica de RAGE por una proteína de fijación neutralizante puede evaluarse por medida de uno o más indicadores de la actividad biológica de RAGE bien conocidos en la técnica, y/o ilustrados en la parte experimental, como en particular, en los Ejemplos 5, 6, 10, y 16 a 19. Por ejemplo, la neutralización de RAGE neutraliza la fijación de RAGE a los globulómeros A β como se mide en los Ejemplos 5 y 6 siguientes.

Una "inhibición de la reducción inducida por el péptido soluble A β 1-40 del volumen de sangre cerebral" determinada *in vivo* en un modelo animal se refiere a una inhibición parcial o completa, como por ejemplo al menos aproximadamente 1 a 10%, al menos aproximadamente 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o más, si se compara con un control no tratado, o en particular, si se compara con un control isotipo de inmunoglobulina negativo, monoclonal o policlonal.

Un "aumento del volumen de sangre cerebral" como *in vivo* en un modelo animal que sobreexpresa APP humano, se refiere a un aumento estadísticamente significativo de CBV, si se compara con un control sin tratar, o en particular, si se compara con un control isotipo de inmunoglobulina negativo, monoclonal o policlonal.

Una "reducción del número de placas de amiloide y/o área de placas de amiloide" como se mide *in vivo* en un modelo animal que sobreexpresan APP humano se refiere a una reducción parcial o completa, como por ejemplo de al menos aproximadamente 1 a 10%, al menos aproximadamente 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o más, si se compara con un control sin tratar, o en particular, si se compara con un control isotipo de inmunoglobulina negativo, monoclonal o policlonal.

Una "inhibición de la escisión de dinamina inducida por el péptido A β 1-40 agregado de neuronas del hipocampo *in vitro*", se refiere a una inhibición parcial o completa, como por ejemplo de al menos aproximadamente 1 a 10%, al menos aproximadamente 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o más, si se compara con un control sin tratar, o en particular, si se compara con un control isotipo de inmunoglobulina negativo, monoclonal o policlonal.

Una "inversión de la reducción inducida por el globulómero A β 1-42 de la transmisión sináptica" *in vitro*, se refiere a una inversión parcial o completa, como por ejemplo de al menos aproximadamente 1 a 10%, al menos aproximadamente 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o más, si se compara con un control sin tratar, o en particular, si se compara con un control isotipo de inmunoglobulina negativo, monoclonal o policlonal.

Un "anticuerpo monoclonal neutralizante" como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, que después de fijación al antígeno específico son capaces de competir e inhibir la fijación del ligando natural para dicho antígeno. En una realización particular de la presente solicitud, los anticuerpos neutralizantes de la presente invención son capaces de competir con RAGE para fijación a al menos uno de sus ligandos, en particular un ligando seleccionado de péptidos A β , globulómeros A β , S 100b y anfoterina, y para prevenir la actividad o función biológica de RAGE.

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de fijación de un anticuerpo para un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-RAGE que se fija a un antígeno RAGE y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-RAGE cuya fijación a RAGE neutraliza la actividad biológica de RAGE.

La "función biológica" o "actividad" de RAGE puede describirse como la de un receptor de la superficie celular transductor de señales para A β o un receptor que media el transporte de proteínas al interior o a través de la célula.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de fijarse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de las células T. En ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen grupos de moléculas de superficie químicamente activa tales como aminoácidos, cadenas

laterales de azúcar, fosforilo, o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que es fijada por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo fija específicamente un antígeno cuando el mismo reconoce preferentemente su antígeno diana en una mixtura compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia de plasmones de superficie", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real por detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *BioTechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

El término " k_{on} ", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto hacer referencia a la constante de tasa de asociación para la asociación de un anticuerpo al antígeno a fin de formar el complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término " k_{off} ", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto hacer referencia a la constante de tasa de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término " k_d ", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto hacer referencia a la constante de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno como se conoce en la técnica.

El término "proteína de fijación marcada", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una proteína con un marcador incorporado que proporciona la identificación de la proteína de fijación. Particularmente, el marcador es un marcador detectable, v.g., la incorporación de un aminoácido radiomarcado o fijación a un polipéptido de restos biotinilo que pueden ser detectados por avidina marcada (v.g., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin carácter limitante, los siguientes: radioisótopos o radionucleidos (v.g., ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (v.g., FITC, rodamina, luminiscentes lantánidos), marcadores enzimáticos (v.g., peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotinilo; epítipos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (v.g., secuencias par de cremalleras de leucina, sitios de fijación para anticuerpos secundarios, dominios de fijación de metales, etiquetas epitópicas); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de fijación, tal como un anticuerpo, enlazada químicamente a un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se utiliza en esta memoria para denotar un compuesto químico, una mixtura de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos. Agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen particularmente, pero sin carácter limitante, toxina de la tos ferina, taxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los términos "cristal", y "cristalizado" como se utilizan en esta memoria, se refieren a un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de redes tridimensionales regulares repetidas de átomos, iones, moléculas (v.g., proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (v.g., complejos antígeno/anticuerpo). Estas redes tridimensionales están dispuestas conforme a relaciones matemáticas específicas que son bien conocidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal se conoce como la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica dada bien definida proporciona la "celdilla unidad" del cristal. La repetición de la celdilla unidad por traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999)."

El término "polinucleótido" como se conoce en esta memoria, significa una forma polímera de dos o más nucleótidos, sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono- y bicatenarias de DNA, pero particularmente es DNA bicatenario.

El término "polinucleótido aislado" como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que significa un polinucleótido (v.g., de DNA genómico, cDNA, o de origen sintético, o alguna combinación de los mismos) tal que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado": no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido con el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; el mismo está enlazado operativamente a un polinucleótido al que no está enlazado en la naturaleza; o no existe en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "vector", como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico el cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de DNA bicatenario al pueden estar ligados segmentos adicionales de DNA. Otro tipo de vector es un vector viral, en el cual segmentos de DNA adicionales pueden estar ligados en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen los mismos (v.g., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (v.g., vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora después de introducción en la célula hospedadora, y por tanto se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están enlazados operativamente los mismos. A dichos vectores se hace referencia en esta memoria como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de DNA recombinante se encuentran a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiamente, dado que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente. Sin embargo, la invención tiene por objeto incluir tales otras formas de vectores de expresión, como vectores virales (v.g., retrovirus deficientes en replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que desempeñan funciones equivalentes.

El término "enlazado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la cual los componentes descritos están en una relación que permite que los mismos funcionen de su manera propuesta. Una secuencia de control "enlazada operativamente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante

se alcanza en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "enlazadas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés y secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a cierta distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", como se utiliza en esta memoria, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las cuales están ligadas aquéllas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción, promotoras e intensificadoras; señales eficientes de procesamiento de RNA tales como señales de remodelación y poliadenilación; secuencias que estabilizan el mRNA citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas, y en caso deseado, secuencias que mejoran la secreción de proteína. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador; en los procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de fijación de ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción; en los eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" tiene por objeto incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias conductoras y secuencias pareja de fusión.

La "transformación", como se define en esta memoria, se refiere a cualquier proceso por el cual DNA exógeno entra en una célula hospedadora. La transformación puede ocurrir en condiciones naturales o artificiales utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede estar basada en cualquier método conocido para la inserción de secuencias extrañas de ácido nucleico en una célula hospedadora procariota o eucariota. El método se selecciona basándose en la célula hospedadora que se transforma y puede incluir, pero sin carácter limitante, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas establemente en las cuales el DNA insertado es capaz de replicación sea como plásmido replicante autónomamente o como parte del cromosoma hospedador. Aquéllas incluyen también células que expresan transitoriamente el DNA o RNA insertado durante periodos de tiempo limitados.

El término "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto hacer referencia a una célula en la cual se ha introducido DNA exógeno. Debe entenderse que tales términos tienen por objeto hacer referencia no sólo a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero se incluye todavía dentro del alcance del término "célula hospedadora" como se utiliza en esta memoria. Las células hospedadoras incluyen particularmente células procariotas y eucariotas seleccionadas de cualquiera de los reinos de la vida. Células eucariotas particulares incluyen células protistas, fúngicas, así como células de plantas y animales. En particular, las células hospedadoras incluyen, pero sin carácter limitante, el linaje de células procariotas *E. coli*; los linajes de células CHO, HEK 293 y COS de mamífero; el linaje de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden utilizarse técnicas estándar para DNA recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (v.g., electroporación y lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación pueden realizarse conforme a especificaciones del fabricante o como se realizan comúnmente en la técnica o tal como se describe en esta memoria. Las técnicas y procedimientos que anteceden pueden realizarse generalmente conforme

a métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y exponen a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase v.g., Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

5 "Organismo transgénico", como se conoce en la técnica y como se utiliza en esta memoria, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en el cual el transgén introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido no expresado naturalmente en el organismo. Un "transgén" es un constructo de DNA, que está integrado de manera estable y operativa en el genoma de una célula a partir del cual se desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

15 Los términos "regular" y "modular" se utilizan intercambiamente y, como se utiliza en esta memoria, se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (v.g., la actividad biológica de RAGE). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de cierta actividad o función de la molécula de interés. Actividades y funciones ilustrativas de una molécula incluyen, pero sin carácter limitante, características de fijación, actividad enzimática, activación de receptores celulares, y transducción de señales.

20 Correspondientemente, el término "modulador", como se utiliza en esta memoria, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (v.g., la actividad biológica de RAGE). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución en la magnitud de cierta actividad o función de una molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador.

25 El término "agonista", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un modulador que, cuando está en contacto con una molécula de interés, causa un aumento en la magnitud de cierta actividad o función de la molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista. Agonistas particulares de interés pueden incluir, pero sin carácter limitante, polipéptidos de RAGE o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualesquiera otras moléculas que se fijan a RAGE.

30 El término "antagonista", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un modulador que, cuando está en contacto con una molécula de interés, causa una disminución en la magnitud de cierta actividad o función de la molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista. Antagonistas ilustrativos incluyen, pero sin carácter limitante, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Pepticuerpos se describen, v.g., en WO01/83.525.

35 Antagonistas particulares de interés incluyen aquéllos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de RAGE. Antagonistas de RAGE pueden incluir, pero sin carácter limitante, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualesquiera otras moléculas, que se fijan a RAGE, particularmente anticuerpos monoclonales que interaccionan con la molécula RAGE. Debe observarse que la interacción con RAGE puede dar como resultado fijación y neutralización de otros ligandos/componentes de la membrana celular, y puede ser útil para funcionamiento aditivo o sinérgico contra enfermedades múltiples.

40

5 Como se utiliza en esta memoria, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, evitar el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, evitar la recurrencia, el desarrollo, el comienzo o la progresión de uno más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o intensificar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (v.g., un agente profiláctico o terapéutico).

10 El término "muestra", como se utiliza en esta memoria, se emplea en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se utiliza en esta memoria, incluye, pero sin carácter limitante, cualquier cantidad de una sustancia procedente de un ser vivo o un ser anteriormente viviente. Tales seres vivos incluyen, pero sin carácter limitante, humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero sin carácter limitante, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

2. Realizaciones Específicas

15 Realizaciones específicas como se describen en esta memoria se enumeran a continuación:

1. Una proteína de fijación aislada que se disocia de RAGE humano con un K_D de 1×10^{-7} M o menos y una constante de tasa de disociación k_{off} de 1×10^{-2} s⁻¹ o menos, determinadas ambas por resonancia de plasmones de superficie.

20 2.

i) la proteína de fijación de la realización 1, que se fija a RAGE humano y modula, en particular inhibe, la capacidad de RAGE para fijarse a al menos uno de sus ligandos, como se determina en un ensayo estándar *in vitro*, como por ejemplo, un ensayo HTRF, como se describe por ejemplo con mayor detalle en la parte experimental, en particular los ejemplos 4 y 5, y las referencias citadas en dicho lugar.

25 ii) la proteína de fijación de la realización 1 que es capaz de inhibir una actividad biológica mediada por RAGE.

30 iii) una proteína de fijación, en particular, conforme a una de las realizaciones anteriores, que tiene al menos una de las actividades biológicas siguientes:

a. Inhibición de la reducción inducida por el péptido A β 1-40 del volumen de sangre cerebral (CBV) *in vivo* en un animal modelo, como ratones hembra C57BL/6, como se describe por ejemplo con mayor detalle en la parte experimental, en particular en el ejemplo 10 y referencias citadas en dicho lugar;

35 b. aumento del volumen de sangre cerebral *in vivo* en un animal modelo que sobreexpresa APP humano, como el modelo de ratón transgénico Tg2576, como se describe por ejemplo con mayor detalle en la parte experimental, en particular el ejemplo 16 y las referencias citadas en dicho lugar;

40 c. reducción del número de placas de amiloide y/o del área de placas de amiloide *in vivo* en un animal modelo que sobreexpresa APP humano, como el modelo de ratón transgénico Tg2576, como se describe por ejemplo con mayor detalle en la parte experimental, en particular el ejemplo 19 y las referencias citadas en dicho lugar;

d. inhibición de la escisión de dinamina inducida por el péptido A β 1-40 agregado de las neuronas del hipocampo *in vitro*, como neuronas del hipocampo tal como se obtienen de ratas embrionarias,

como se describe por ejemplo con mayor detalle en la parte experimental, en particular el ejemplo 17 y referencias citadas en dicho lugar;

e. inversión de la reducción inducida por el globulómero A β 1-42 de la transmisión sináptica in vitro, determinada en cultivos de cortes de hipocampo, como se describe por ejemplo con mayor detalle en la parte experimental, en particular el ejemplo 18 y referencias citadas en dicho lugar.

5 3. La proteína de fijación de la realización 1 ó 2, en donde el ligando se selecciona de péptidos A β , globulómeros A β , S 100 b y anfoterina.

10 4. La proteína de fijación de una de las realizaciones anteriores, que es una proteína de fijación neutralizante.

5. La proteína de fijación de una de las realizaciones anteriores, que es capaz de bloquear, en particular inhibir, la fijación de globulómero A β a RAGE humano.

15 6. La proteína de fijación de una de las realizaciones anteriores en la cual dicho globulómero A β es A β 1-42.

7. La proteína de fijación de una de las realizaciones anteriores, en la cual dicha proteína de fijación interacciona con al menos uno, como por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 residuos de aminoácido del dominio C1 y/o C2 de RAGE humano.

20 8. La proteína de fijación conforme a una de las realizaciones anteriores, que es un anticuerpo humanizado.

9. La proteína de fijación conforme a una de las realizaciones anteriores, que comprende un dominio de fijación de antígeno, dicha proteína de fijación capaz de fijar un epítipo de una molécula RAGE humana, comprendiendo dicho dominio de fijación de antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo CDR-H3 de secuencias de aminoácido constituidas por SEQ ID NO: 4, 12 y 20; y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% con una de dichas secuencias;

25 el grupo CDR-L3 de secuencias de aminoácidos constituido por SEQ ID NO: 8, 16 y 24; y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% con una de dichas secuencias;

30 10. Una proteína de fijación que comprende un dominio de fijación de antígeno, dicha proteína de fijación capaz de fijar un epítipo de una molécula RAGE humana, comprendiendo dicho dominio de fijación de antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

35 el grupo CDR-H3 de secuencias de aminoácido constituidas por SEQ ID NO: 4, 12 y 20; y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% con una de dichas secuencias;

40 el grupo CDR-L3 de secuencias de aminoácidos constituido por SEQ ID NO: 8, 16 y 24; y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% con una de dichas secuencias.

11. La proteína de fijación conforme a una de las realizaciones anteriores, que comprende adicionalmente al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo CDR-H1 constituido por SEQ ID

ES 2 577 718 T3

NO: 2, 10, 18; o seleccionada del grupo CDR-H2 constituido por SEQ ID NO: 3, 11, 19; o seleccionada del grupo CDR-L1 constituido por SEQ ID NO: 6, 14, 22; o seleccionada del grupo CDR-L2 constituido por SEQ ID NO: 7, 15, 23;

5 y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% con una de dichas secuencias.

12. la proteína de fijación conforme a una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la cual dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

SEQ ID NO.: 2	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:1
SEQ ID NO.: 3	Residuos 50-68 de SEQ ID NO.:1
SEQ ID NO.: 4	Residuos 101-108 de SEQ ID NO.:1
SEQ ID NO.: 6	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:5
SEQ ID NO.: 7	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:5
SEQ ID NO.: 8	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:5
SEQ ID NO.: 10	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:9
SEQ ID NO.: 11	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:9
SEQ ID NO.: 12	Residuos 97-109 de SEQ ID NO.:9
SEQ ID NO.: 14	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:13
SEQ ID NO.: 15	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:13
SEQ ID NO.: 16	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:13
SEQ ID NO.: 18	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:17
SEQ ID NO.: 19	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:17
SEQ ID NO.: 20	Residuos 99-109 de SEQ ID NO.:17
SEQ ID NO.: 22	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:21
SEQ ID NO.: 23	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:21
SEQ ID NO.: 24	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:21

10 13. La proteína de fijación conforme a la realización 12, que comprende al menos tres CDRs que se seleccionan de un conjunto de CDR de dominio variable constituido por:

ES 2 577 718 T3

Conjunto VH 7F9		
VH 7F9 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:1	SEQ ID NO: 2
VH 7F9 CDR-H2	Residuos 50-68 de SEQ ID NO.:1	SEQ ID NO: 3
VH 7F9 CDR-H3	Residuos 101-108 de SEQ ID NO.:1	SEQ ID NO: 4
Conjunto VL 7F9		
VL 7F9 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:5	SEQ ID NO: 6
VL 7F9 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:5	SEQ ID NO: 7
VL 7F9 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:5	SEQ ID NO: 8
Conjunto VH 11E6		
VH 11E6 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:9	SEQ ID NO: 10
VH 11E6 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:9	SEQ ID NO: 11
VH 11E6 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO.:9	SEQ ID NO: 12
Conjunto VL 11E6		
VL 11E6 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:13	SEQ ID NO: 14
VL 11E6 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:13	SEQ ID NO: 15
VL 11E6 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:13	SEQ ID NO: 16
Conjunto VH 4E5		
VH 4E5 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:17	SEQ ID NO: 18
VH 4E5 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:17	SEQ ID NO: 19
VH 4E5 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO.:17	SEQ ID NO: 20
Conjunto VL 4E5		
VL 4E5 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:21	SEQ ID NO: 22
VL 4E5 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:21	SEQ ID NO: 23
VL 4E5 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:21	SEQ ID NO: 24

o un conjunto de dominio variable en el cual al menos una de dichas tres CDRs es una secuencia de aminoácidos de CDR modificada que tiene una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, con la secuencia parental.

14. La proteína de fijación conforme a la realización 13, que comprende al menos dos conjuntos CDR de dominio variable.

15. La proteína de fijación conforme a la realización 14, en la cual dichos al menos dos conjuntos CDR de dominio variable se seleccionan de un grupo constituido por:
- conjunto VH 7F9 y conjunto VL 7F9;
 - conjunto VH 4E5 y VL 4E5 y
 - 5 conjunto VH 11E6 y conjunto VL 11E6.
16. La proteína de fijación conforme a una de las realizaciones anteriores, que comprende adicionalmente un marco aceptor humano.
- 10 17. La proteína de fijación conforme a la realización 16, en la cual dicho marco aceptor humano comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 y 55.
18. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada seleccionado de SEQ ID NO: 56 y 57; y/o al menos un dominio variable de cadena ligera seleccionado de SEQ ID NO: 58 y 59.
- 15 19. La proteína de fijación de la realización 18, en donde dicha proteína de fijación comprende dos dominios variables, en donde dichos 2 dominios variables tienen secuencias de aminoácido seleccionadas de:
- 20 SEQ ID NOs: 56 y 58; 56 y 59;
 - SEQ ID NOs: 57 y 58; 57 y 59.
20. La proteína de fijación conforme a una cualquiera de las realizaciones 16 a 19, en donde dicho marco de aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región marco en un residuo clave, seleccionado dicho residuo clave del grupo constituido por:
- 25 un residuo adyacente a una CDR;
 - un residuo de sitio de glicosilación,
 - un residuo raro,
 - un residuo capaz de interactuar con un epítipo de RAGE,
 - 30 un residuo capaz de interactuar con una CDR;
 - un residuo canónico;
 - un residuo de contacto entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera;
 - un residuo dentro de una zona Vernier;
 - un residuo N-terminal capaz de formación de para-glutamato; y
 - 35 un residuo en una región que se solapa entre una CDR 1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un primer marco de cadena pesada definida por Kabat.
21. La proteína de fijación conforme a la realización 20, en la cual dichos residuos clave se seleccionan del grupo constituido por (posición de la secuencia de cadena pesada): 1, 2, 68, 70, 72, 76, 85, 89, 95 (posición de la
- 40 secuencia de cadena ligera): 11, 13, 43, 49, 58, 70, 87.
22. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la cual la proteína de fijación es un dominio variable humano de consenso.

23. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones 16 a 22, en la cual dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región marco, como por ejemplo 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, ó 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ó 9 sustituciones, en donde la secuencia de aminoácidos del marco tiene una identidad de al menos 65% con la secuencia de dicho marco aceptor humano y comprende al menos 70 residuos de aminoácido idénticos a dicho marco aceptor humano.
24. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la cual dicha proteína de fijación comprende al menos un dominio variable (mutado en el marco) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:
- (secuencias de cadena pesada) SEQ ID NO: 62, 67, 68 y 69;
(secuencias de cadena ligera) SEQ ID NO: 63, 64, 65 y 66.
25. La proteína de fijación de la realización 24, en donde dicha proteína de fijación comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de los grupos constituidos por
- SEQ ID NOs: 62 y 63 ; 62 y 64 ; 62 y 65 ; 62 y 66 ;
SEQ ID NOs: 67 y 63 ; 67 y 64 ; 67 y 65 ; 67 y 66 ;
SEQ ID NOs: 68 y 63 ; 68 y 64 ; 68 y 65 ; 68 y 66.
26. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicha proteína de fijación es capaz de fijar una diana, seleccionada de moléculas RAGE.
27. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores capaz de fijarse a RAGE humano.
28. La proteína de fijación de la realización 27, que tiene al menos una de las características funcionales adicionales siguientes:
- fijación a RAGE de ratón y rata.
29. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde la proteína de fijación es capaz de modular, en particular neutralizar, una función biológica de una diana, seleccionada de moléculas RAGE.
30. La proteína de fijación de la realización 29, en donde dicha proteína de fijación modula, en particular inhibe, la capacidad de RAGE para fijarse a al menos uno de sus ligandos.
31. La proteína de fijación de la realización 30, en donde dicha proteína de fijación modular, en particular inhibe, al menos una de las interacciones siguientes:
- Fijación de RAGE humano a péptidos A β , globulómeros A β , S 100 b y anfoterina.
32. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicha proteína de fijación es capaz de neutralizar una actividad biológica de RAGE, como por ejemplo escisión inducida por A β de dinamina en neuronas primarias, déficits sinápticos inducidos por globulómeros en cortes de hipocampo, disminución inducida por A β en CBV.

33. La proteína de fijación de la realización 32, en donde la molécula RAGE es RAGE o un fragmento de RAGE, como sRAGE.

34. La proteína de fijación de la realización 33, en donde el RAGE se selecciona de humano, rata y ratón.

5

35. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicha proteína de fijación tiene una constante de tasa de asociación (k_{on}) a dicha diana seleccionada del grupo constituido por: al menos aproximadamente $10^2 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^6 M^{-1} s^{-1}$, y al menos aproximadamente $10^7 M^{-1} s^{-1}$ como se mide por resonancia de plasmones de superficie.

10

36. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicha proteína de fijación tiene una constante de tasa de disociación (k_{off}) a dicha diana seleccionada del grupo constituido por: como máximo aproximadamente $10^{-2} s^{-1}$; como máximo aproximadamente $10^{-3} s^{-1}$; como máximo aproximadamente $10^{-4} s^{-1}$; como máximo aproximadamente $10^{-5} s^{-1}$; y como máximo aproximadamente $10^{-6} s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmones de superficie.

15

37. La proteína de fijación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicha proteína de fijación tiene una constante de disociación (K_D) a dicha diana seleccionada del grupo constituido por: como máximo aproximadamente $10^{-7} M$; como máximo aproximadamente $10^{-8} M$; como máximo aproximadamente $10^{-9} M$; como máximo aproximadamente $10^{-10} M$; como máximo aproximadamente $10^{-11} M$; como máximo aproximadamente $10^{-12} M$; y como máximo $10^{-13} M$.

20

38. Un constructo de anticuerpos que comprende una proteína de fijación descrita en una cualquiera de las realizaciones anteriores, comprendiendo adicionalmente dicho constructo de anticuerpos un polipéptido enlazador o un dominio constante de inmunoglobulina.

25

39. El constructo de anticuerpos conforme a la realización 38, en el cual dicha proteína de fijación se selecciona del grupo constituido por:

30

una molécula de inmunoglobulina,
un anticuerpo monoclonal,
un anticuerpo quimérico,
un anticuerpo injertado en CDR,
un anticuerpo humanizado,

35

un Fab,
un Fab',
un F(ab')₂,
un Fv,

40

un Fv enlazado a disulfuro,
un scFv,
un anticuerpo de dominio simple,
un diacuerpo,
un anticuerpo multiespecífico,

un anticuerpo de especificidad dual,
una inmunoglobulina de dominio variable dual, y
un anticuerpo biespecífico.

- 5 40. El constructo de anticuerpos conforme a una cualquiera de las realizaciones 38 y 39, en donde dicha proteína de fijación comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo constituido por:
- 10 un dominio constante de IgM humana,
un dominio constante de IgG1 humana,
un dominio constante de IgG2 humana,
un dominio constante de IgG3 humana,
un dominio constante de IgG4 humana,
un dominio constante de IgE humana,
un dominio constante de IgD humana,
15 un dominio constante de IgA1 humana,
un dominio constante de IgA2 humana,
un dominio constante de IgY humana
y dominios mutados correspondientes.
- 20 41. El constructo de anticuerpos conforme a una cualquiera de las realizaciones 38 a 40, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: SEQ ID NO: 25, 41, 42, y 26.
- 25 42. Un conjugado de anticuerpos que comprende un constructo de anticuerpos descrito en una cualquiera de las realizaciones 38 a 41, comprendiendo adicionalmente dicho conjugado de anticuerpos un agente seleccionado del grupo constituido por: una molécula de inmunoadhesión, un agente de imagen, un agente terapéutico, y un agente citotóxico.
- 30 43. El conjugado de anticuerpos conforme a la realización 42, en el cual dicho agente es un agente de imagen seleccionado del grupo constituido por un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético, y biotina.
- 35 44. El conjugado de anticuerpos conforme a la realización 43, en el cual dicho agente de imagen es un radiomarcador seleccionado del grupo constituido por: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm .
- 40 45. El conjugado de anticuerpos conforme a la realización 42, el cual dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo constituido por: un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.
46. El constructo de anticuerpos conforme a una cualquiera de las realizaciones 38 a 41, en el cual dicha proteína de fijación posee un patrón de glicosilación humano.

47. El conjugado de anticuerpos conforme a cualquiera de las realizaciones 42 a 45 en el cual dicha proteína de fijación posee un patrón de glicosilación humano.
- 5 48. La proteína de fijación conforme a una cualquiera de las realizaciones 1 a 37, en donde dicha proteína de fijación existe como un cristal.
49. El constructo de anticuerpos conforme a una cualquiera de las realizaciones 38 a 41, en donde dicho constructo de anticuerpos existe como un cristal.
- 10 50. El conjugado de anticuerpos conforme a una cualquiera de las realizaciones 42 a 45, en donde dicho constructo de anticuerpos existe como un cristal.
51. La proteína de fijación conforme a la realización 48, en donde dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada exento de portador.
- 15 52. El constructo de anticuerpos conforme a la realización 49, en donde dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada exento de portador.
53. El conjugado de anticuerpos conforme a la realización 50, en donde dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada exento de portador.
- 20 54. La proteína de fijación conforme a la realización 48, en donde dicha proteína de fijación tiene una semivida *in vivo* mayor que la contrapartida soluble de dicha proteína de fijación.
- 25 55. El constructo de anticuerpos conforme a la realización 49, en donde dicho constructo de anticuerpos tiene una semivida *in vitro* mayor que la contrapartida soluble de dicho constructo de anticuerpos.
56. El conjugado de anticuerpos conforme a la realización 50, en donde dicho conjugado de anticuerpos tiene una semivida *in vivo* mayor que la contrapartida soluble de dicho conjugado de anticuerpos.
- 30 57. La proteína de fijación conforme a la realización 48, en donde dicha proteína de fijación retiene actividad biológica.
58. El constructo de anticuerpos conforme a la realización 49, en donde dicho constructo de anticuerpos retiene actividad biológica.
- 35 59. El conjugado de anticuerpos conforme a la realización 50, en donde dicho conjugado de anticuerpos retiene actividad biológica.
- 40 60. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína de fijación de cualquiera de las realizaciones 1-37.

61. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de un constructo de anticuerpos de una cualquiera de las realizaciones 38-41.
- 5 62. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de un conjugado de anticuerpos de una cualquiera de las realizaciones 42-45.
63. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado conforme a una cualquiera de las realizaciones 60 a 62.
64. El vector de la realización 63, en donde dicho vector se selecciona del grupo constituido por pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE, y pBJ.
- 10
65. Una célula hospedadora que comprende un vector conforme a una cualquiera de las realizaciones 63 y 64.
66. La célula hospedadora conforme a la realización 65, en donde dicha célula hospedadora es una célula procariota.
- 15
67. La célula hospedadora conforme a la realización 66, en donde dicha célula hospedadora es E. coli.
68. La célula hospedadora conforme a la realización 67, en donde dicha célula hospedadora es una célula eucariota.
- 20
69. La célula hospedadora conforme a la realización 68, en donde dicha célula eucariota se selecciona del grupo constituido por una célula protista, célula animal, célula de planta y célula fúngica.
70. La célula hospedadora conforme a la realización 69, en donde dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo constituido por: una célula de mamífero, una célula de ave, y una célula de insecto.
- 25
71. La célula hospedadora conforme a la realización 69, en donde dicha célula hospedadora se selecciona de células HEK, células CHO, células COS y células de levadura.
- 30
72. La célula hospedadora conforme a la realización 71, en donde dicha célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
73. La célula hospedadora conforme a la realización 70, en donde dicha célula hospedadora es una célula de insecto Sf9.
- 35
74. Un método de producción de una proteína capaz de fijar RAGE, que comprende cultivar una célula hospedadora de una cualquiera de las realizaciones 65 a 73 en el medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de fijación capaz de fijar RAGE.
- 40
75. Una proteína producida conforme al método de la realización 74.
76. Una composición para la liberación de una proteína de fijación, comprendiendo dicha composición

- (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende un producto proteínico cristalizado conforme a una cualquiera de las realizaciones 48 a 50, y un ingrediente; y
- (b) al menos un portador polímero.

5 77. La composición conforme a la realización 76, en donde dicho portador polímero es un polímero seleccionado de uno o más del grupo constituido por: poli (ácido acrílico), poli (ciano-acrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilenglicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(organo) fosfazeno], poli (ortoésteres), poli (vinil-alcohol), poli (vinilpirrolidona), copolímeros anhídrido maleico-alquil-viniléter, polioles
10 Pluronic, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

78. La composición conforme a la realización 76, en la cual dicho ingrediente se selecciona del grupo constituido por albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilen-glicol y polietilen-glicol.
15

79. Un método para tratamiento de un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad eficaz de la composición conforme a una cualquiera de las realizaciones 77 y 78.

80. Una composición farmacéutica que comprende el producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59, y un portador farmacéuticamente aceptable.
20

81. La composición farmacéutica de la realización 80, en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable se comporta como adyuvante útil para aumentar la absorción, o dispersión de dicha proteína de fijación.

25 82. La composición farmacéutica de la realización 81, en la que dicho adyuvante es hialuronidasa.

83. La composición farmacéutica de la realización 82 que comprende adicionalmente al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el cual la actividad de RAGE es perjudicial.

30 84. La composición farmacéutica de la realización 83, en donde dicho agente adicional se selecciona del grupo constituido por: agente terapéutico, agente de imagen, agente citotóxico, inhibidores de angiogénesis; inhibidores de quinasas; bloqueadores de moléculas de co-estimulación; bloqueadores de moléculas de adhesión; anticuerpos anti-citocinas o fragmentos funcionales de los mismos; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK 506; marcador o informador detectable; un antagonista de TNF; un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco
35 anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, un inmunizador, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un fármaco de reemplazamiento hormonal, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación contra el asma, un β -agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citocina, y un
40 antagonista de citocinas. Ejemplos adicionales son: Dimebón, anticuerpos anti-A β , inhibidores de β -secretasas, moduladores tau, mejoradores de la cognición tales como v.g. antagonistas 5-HT 6, inhibidor de colessterinasa (v.g., tactrina, donepezil, rivastigmina o galantamina), un bloqueador parcial del receptor de NMDA (v.g., memantina), un mimético de glicosaminoglicanos (v.g., Alzhemed), un inhibidor o modulador alostérico de gamma-secretasa (v.g., R-

flurbiprofeno), un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina bloqueador de la hormona luteinizante (v.g., leuprorelina), un antagonista del receptor 5-HT1A de serotonina, un agente quelante, un bloqueador de los canales de calcio tipo L selectivo neuronal, un inmunomodulador, un inhibidor de la fibrilógenesis de amiloide o inhibidor de la deposición de proteína amiloide (v.g., M266), otro anticuerpo (v.g., bapineuzumab), un antagonista del receptor 5-HT1a, un inhibidor de PDE4, un agonista de histamina, una proteína receptora para productos finales de la glicación avanzada, un estimulador de PARP, un antagonista del receptor 6 de serotonina, un agonista del receptor 5-HT4, un esteroide humano, un estimulante de la absorción de glucosa que mejora el metabolismo neuronal, un antagonista selectivo de CB 1, un agonista parcial de los receptores de benzodiazepina, un antagonista o inhibidor de la producción de amiloide β , un inhibidor de la deposición de amiloide β , un antagonista parcial de NNR alfa-7, un agente terapéutico direccionado a PDE4, un inhibidor de la traducción de RNA, un agonista muscarínico, un agonista del receptor de factor de crecimiento de los nervios, un agonista del receptor NGF y un modulador de terapia génica.

85. Un método para reducir la actividad de RAGE humano que comprende poner en contacto RAGE humano con el producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59 de tal modo que se reduce la actividad de RAGE humano.

86. Un método para reducir la fijación de hRAGE a al menos un ligando seleccionado de péptidos A β , globulómeros, S 100 b y anfoterina en un individuo que se encuentra en necesidad de ello, que comprende el paso de administrar al individuo un producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59.

87. Un método de tratamiento de un individuo para un trastorno asociado con actividad de RAGE que comprende el paso de administrar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos un producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59.

88. Un método para reducir la actividad de RAGE en un individuo que padece un trastorno en el cual la actividad de RAGE es perjudicial, que comprende administrar al individuo un producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

89. El método de la realización 88, en el cual el trastorno comprende enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo que comprende Esclerosis Lateral Amiotrófica, Lesión del Plexo Braquial, Lesión Cerebral, con inclusión de lesión cerebral traumática, Parálisis Cerebral, Ataxia de Friedrich, Guillain Barré, Leucodistrofias, Esclerosis Múltiple, Post Polio, Espina Bífida, Lesión de la Médula Espinal, Atrofia Muscular Espinal, Tumores Medulares, Ictus, Mielitis Transversa, Demencia, Demencia Senil, Deterioro Cognitivo Moderado, Demencia Relacionada con Alzheimer, Corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, Morbo de Parkinson, síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia grave, trauma de nervios, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión agudo, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, nefropatía diabética, sepsis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias afines; Diabetes y complicaciones resultantes como retinopatía diabética, nefropatía, complicaciones vasculares; complicaciones ateroscleróticas, fibrosis pulmonar, cáncer, especialmente melanomas, y otras amiloidosis.

90. Una CDR aislada de una proteína de fijación como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 51.

-

91. Una proteína de fijación aislada que interacciona específicamente con al menos un epítipo de una proteína del Receptor de los Productos Finales de la Glicación Avanzada (RAGE).

92. La proteína de fijación aislada de la realización 91, en donde la proteína aislada es un anticuerpo monoclonal o fragmento de fijación de antígeno del mismo.
- 5 93. El anticuerpo monoclonal o fragmento de fijación de antígeno conforme a la realización 92, que comprende un dominio VH y un dominio VL.
94. El anticuerpo monoclonal conforme a la realización 92 en donde dicho anticuerpo monoclonal disminuye la capacidad de RAGE para fijarse a sus ligandos.
- 10 25. Los ligandos conforme a la realización 94 en donde los ligandos comprenden péptidos A β , globulómeros, S 100b y anfoterina.
96. El anticuerpo monoclonal conforme a la realización 92, en donde dicho anticuerpo es capaz de bloquear la fijación de globulómero A β a RAGE.
- 15 97. El anticuerpo monoclonal o fragmento de fijación de antígeno del mismo conforme a la realización 92 en donde el anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno comprende:
- 20 una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 9, y SEQ ID NO. 17;
una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada grupo constituido por SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 13, y SEQ ID NO. 21;
una región constante de cadena pesada de la inmunoglobulina humana gamma 1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 25; y
- 25 una región constante de cadena ligera de la inmunoglobulina humana kappa con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 26.
98. El anticuerpo monoclonal de la realización 93, en el cual el dominio de fijación de antígeno comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de homología con la secuencia seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, y 20.
- 30 99. El anticuerpo monoclonal conforme a la realización 93 en el cual dicho dominio VH comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de homología con la secuencia seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 9, y SEQ ID NO. 17.
- 35 100. El anticuerpo monoclonal conforme a la realización 99 en el que dicho dominio VH comprende al menos una región CDR que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de homología con la secuencia seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 10, 11, 12, 18, 19, y 20.
- 40 101. El anticuerpo monoclonal conforme a la realización 100 en el que dicho dominio VH comprende al menos 3 regiones CDR seleccionadas del conjunto de SEQ ID NOs: 2, 3,4; SEQ ID NOs. 10, 11, 12; SEQ ID NOs. 18, 19, y 20.

102. El anticuerpo monoclonal conforme a la realización 93, en el que dicho dominio VL comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de homología con la secuencia seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 13, y SEQ ID NO. 21.
- 5
103. El anticuerpo monoclonal conforme a la realización 102, en la que dicho dominio VL comprende al menos una región CDR que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de homología con la secuencia seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 6, 7, 8, 14, 15, 16, 22, 23, y 24.
- 10
104. El anticuerpo monoclonal conforme a la realización 103 el que dicho dominio VL comprende al menos 3 regiones CDR seleccionadas del conjunto de SEQ ID NOs: 6, 7, 8; SEQ ID NOs. 14, 15, 16; SEQ ID NOs. 22, 23, y 24.
- 15
105. El anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno de la realización 92, en donde dicho anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno es un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo quimérico, un fragmento de fijación de antígeno de un anticuerpo humanizado, o un fragmento de fijación de antígeno de un anticuerpo quimérico.
- 20
106. El anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno de la realización 92, en donde dicho anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno es un fragmento de fijación de antígeno seleccionado del grupo constituido por un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fv.
- 25
107. Un linaje de células de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal o fragmento de fijación de antígeno del mismo conforme a la realización 96.
- 30
108. El linaje de células de hibridoma de la realización 107, en el que el hibridoma se selecciona del grupo constituido por hibridoma de ratón, humano, rata, oveja, cerdo, ganado, cabra, y caballo.
- 35
109. Un linaje de células de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal, que se fija específicamente a al menos un epítipo de una proteína RAGE.
- 40
110. El linaje de células de hibridoma de la realización 107, en el que el hibridoma se selecciona del grupo constituido por hibridoma de ratón y humano.
111. El linaje de células de hibridoma de la realización 107, en el que el hibridoma se selecciona del grupo constituido por hibridoma de rata, oveja, cerdo, ganado, cabra, y caballo.
112. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado que comprende el ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la realización 97, en el que dicho vector se selecciona del grupo constituido por pcDNA; pTT; pTT3; pEFBOS; pBV; pJV; y pBJ.
113. Una célula hospedadora transformada con el vector conforme a la realización 112, en donde la célula hospedadora se selecciona del grupo constituido por célula de protista, célula animal, célula de planta y célula fúngica.

114. La célula hospedadora de la realización 113 en donde la célula animal es una célula de mamífero seleccionada del grupo que comprende HEK 293, CHO y COS.

5 115. Un método de producción de la proteína de fijación aislada conforme a la realización 91, que comprende cultivar una célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir la proteína de fijación, recoger el medio de cultivo, y purificar la proteína de fijación aislada producida.

10 116. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal o porción de fijación de antígeno conforme a cualquiera de las realizaciones 99 ó 102 y un portador farmacéuticamente aceptable.

117. Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende administrar los anticuerpos monoclonales de las realizaciones 99 ó 102 que se fijan al dominio C2 en RAGE.

15 118. El método de la realización 117, en el que el trastorno comprende enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo del grupo que comprende Esclerosis Lateral Amiotrófica, Lesión del Plexo Braquial, Lesión Cerebral, con inclusión de lesión cerebral traumática, Parálisis Cerebral, Ataxia de Friedrich, Guillain Barre, Leucodistrofias, Esclerosis Múltiple, Post Polio, Espina Bífida, Lesión de la Médula Espinal, Atrofia Muscular Espinal, Tumores Medulares, Ictus, Mielitis Transversa, Demencia, Demencia Senil, Deterioro Cognitivo Moderado, Demencia Relacionada con Alzheimer, Corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, Morbo de Parkinson, 20 síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia grave, trauma de nervios, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión agudo, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, nefropatía diabética, sepsis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias afines.

25 119. El anticuerpo de la realización 105, que comprende al menos una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 56 y 57.

30 120. El anticuerpo de la realización 105, que comprende al menos una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 58 y 59.

121. El anticuerpo de la realización 119 o 120, modificado adicionalmente por 1 a 10 mutaciones en una secuencia VH o VL.

35 122. El anticuerpo de la realización 121, en el que las mutaciones se seleccionan de retromutaciones de marco, y mutaciones de Vernier y residuos de interfaz VH/VL.

40 123. Un anticuerpo o proteína de fijación de una de las realizaciones que anteceden, que inhibe la fijación de RAGE a un complejo HMGB 1-CpG DNA; o un anticuerpo o proteína de fijación de una de las realizaciones que anteceden que no inhibe la fijación de RAGE a un complejo HMGB 1-CpG DNA.

3. Generación de anticuerpos anti-RAGE

3.1. General

Los anticuerpos de la solicitud pueden generarse por inmunización de un hospedador adecuado (v.g., vertebrados, con inclusión de humanos, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado, caballos, reptiles, peces, anfibios, y huevos de aves, reptiles y peces). Para generar los anticuerpos de la presente solicitud, el hospedador se inmuniza con un polipéptido inmunógeno RAGE y o fragmento del mismo de la invención. El término "inmunización" se refiere en esta memoria al proceso de presentación de un antígeno a un repertorio inmune si dicho repertorio existe en un organismo natural genéticamente inalterado, o un organismo transgénico, con inclusión de los modificados para presentar un repertorio inmune humano artificial. Análogamente, una "preparación inmunógena" es una formulación de antígeno que contiene adyuvantes u otros aditivos que podrían aumentar la inmunogenicidad del antígeno.

5
10
15
20

La inmunización de animales puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. Véase, v.g. Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Métodos para inmunización de animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado y caballos son bien conocidos en la técnica. Véase, v.g., Harlow y Lane y el documento Patentes U.S. No. 5, 994,619. En una realización particular, el antígeno RAGE se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramil-dipéptidos) o ISCOM (complejos imunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger el polipéptido contra la dispersión rápida por secuestro del mismo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan el hospedador a secretar factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Particularmente, si se está administrando un polipéptido, el protocolo de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, extendidas a lo largo de varias semanas.

25

Se contempla que el animal hospedador se inmuniza con el antígeno asociado a la membrana celular de una célula intacta o alterada y los anticuerpos de la presente solicitud se identifican por fijación a un polipéptido inmunógeno de la invención. Después de inmunización del hospedador animal con el antígeno, pueden obtenerse anticuerpos del animal. El suero que contiene anticuerpos se obtiene del animal por sangrado o sacrificio del animal. El suero puede utilizarse tal como se obtiene del animal, puede obtenerse del suero una fracción de inmunoglobulina, o los anticuerpos pueden purificarse a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de esta manera son policlonales, teniendo por tanto un conjunto heterogéneo de propiedades.

30 3.2 Anticuerpos monoclonales anti-RAGE utilizando tecnología de hibridoma

35
40

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando una gran diversidad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de presentación de fago, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales utilizando técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la técnica y expuestas, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en esta memoria no está limitado a anticuerpos producidos por tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o de fago, y no al método por el que se produce el mismo.

Los métodos para producción y selección de anticuerpos específicos utilizando tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En una realización, la presente invención proporciona métodos de

generación de anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en donde, particularmente, el hibridoma se genera por fusión de esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención, con células de mieloma, seguido por cribado de los hibridomas resultantes de la fusión respecto a clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de fijar un polipéptido de la invención. Resumidamente, pueden inmunizarse ratones con un antígeno RAGE. En una realización particular, el antígeno RAGE se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramil-dipéptidos) o ISCOM (complejos imunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger el polipéptido contra la dispersión rápida por secuestro del mismo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan el hospedador a secretar factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Particularmente, si se está administrando un polipéptido, el protocolo de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, extendidas a lo largo de varias semanas.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, v.g., se detectan anticuerpos específicos para el antígeno RAGE en el suero de ratón, se extirpa el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan luego por técnicas bien conocidas con cualesquiera células de mieloma adecuadas, por ejemplo células del linaje de células SP 20, disponible de la ATCC. Se seleccionan hibridomas y se clonan por dilución limitada. Los clones de hibridoma se ensayan luego por métodos conocidos en la técnica respecto a células que secreten anticuerpos capaces de fijar RAGE. Fluido de ascitis, que contiene generalmente niveles elevados de anticuerpos, puede generarse por inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

En otra realización, pueden prepararse hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B esplénicas se fusionan a células de mieloma inmortalizadas como es bien conocido en la técnica. Véase, v.g., Harlow y Lane, *supra*. En una realización particular, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (un linaje de células no secretoras). Después de fusión y selección de antibióticos, los hibridomas se someten a cribado utilizando RAGE o una porción del mismo, o una célula que expresa RAGE. En una realización particular, el cribado inicial se realiza utilizando un inmunoensayo unido a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), particularmente un ELISA. Un ejemplo de selección ELISA se proporciona en WO 00/37504.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-RAGE se seleccionan, clonan y criban adicionalmente respecto a características deseables, con inclusión de crecimiento robusto del hibridoma, producción alta de anticuerpos y características deseables de anticuerpos, como se expone con mayor detalle más adelante. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmune, v.g. ratones lampiños, o en cultivo de células *in vitro*. Métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por quienes poseen experiencia ordinaria en la técnica.

En una realización particular, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se ha descrito arriba. En otra realización particular, los hibridomas se producen de una especie no humana y distinta de ratón tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los cuales un mieloma humano no secretor se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-RAGE.

Fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

3.3 Anticuerpos monoclonales anti-RAGE utilizando SLAM

En otro aspecto de la invención, se generan anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos simples aislados utilizando un procedimiento al que se hace referencia en la técnica como el método de anticuerpos linfocíticos seleccionados (SLAM), como se describe en la patente U.S. 5, 627,052, Publicación PCT WO 92/02551 y en Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. En este método, células simples que secretan anticuerpos de interés, v.g. linfocitos derivados de uno cualquiera de los animales inmunizados arriba descritos se someten a cribado utilizando un ensayo en placas hemolíticas con especificidad de antígeno, en el que el antígeno RAGE, una subunidad de RAGE, o un fragmento del mismo, se acopla a glóbulos rojos de oveja utilizando un enlazador, tal como biotina, y se utiliza para identificar células simples que secretan anticuerpos con especificidad para RAGE. Después de la identificación de las células de interés que secretan anticuerpos, se rescatan de las células cDNAs de la región variable de cadena pesada y ligera por PCR de transcriptasa inversa, y estas regiones variables pueden expresarse luego, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (v.g., regiones constantes humanas), en células hospedadoras de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células hospedadoras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden analizarse y seleccionarse después *in vitro*, por ejemplo por lavado en batea de las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpos para RAGE. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden manipularse ulteriormente *in vitro*, por ejemplo por métodos de maduración de afinidad *in vitro* tales como los descritos en la publicación PCT WO 97/29.131 y la publicación PCT WO 00/56772.

3.4 Anticuerpos monoclonales anti-RAGE utilizando animales transgénicos

En otra realización de la presente invención, se producen anticuerpos por inmunización de un animal no humano que comprende algo, o la totalidad, del locus de inmunoglobulinas humano con un antígeno RAGE. En una realización particular, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una variedad de ratón modificada por ingeniería genética que comprende grandes fragmentos de los loci de inmunoglobulinas humanos y es deficiente en producción de anticuerpos de ratón. Véanse, v.g., Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994) y las patentes de los Estados Unidos 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 y 6,130,364. Véanse también WO 91/10741, publicada el 25 de julio 1991, WO 94/02602, publicada el 3 de febrero 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, publicadas ambas el 31 de octubre 1996, WO 98/16654, publicada el 23 de abril 1998, WO 98/24893, publicada el 11 de junio 1998, WO 98/50433, publicada el 12 de noviembre 1998, WO 99/45031, publicada el 10 de septiembre 1999, WO 99/53049, publicada el 21 de octubre 1999, WO 00 09560, publicada el 24 de febrero 2000 y WO 00/037504, publicada el 29 de junio 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos, y genera mAbs humanos con especificidad de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos por introducción de fragmentos YAC de configuración de la línea germinal del tamaño de megabases de

los loci de cadena pesada y loci de cadena ligera x humanos. Véase Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998).

3.5 Anticuerpos monoclonales anti-RAGE utilizando bibliotecas de anticuerpos recombinantes

5 Pueden utilizarse también métodos *in vitro* para producir los anticuerpos de la invención, en los cuales se somete a cribado una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tenga la especificidad de fijación deseada. Métodos para tal cribado de bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos, por ejemplo, en Ladner et al. Patente U.S. No. 5,223,409; Kang et al. Publicación PCT No. WO 10 92/18619; Dower et al. Publicación PCT No. WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT No. WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT No. WO 92/15679; Breitling et al. Publicación PCT No. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT No. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación PCT No. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbás et al. (1991) PNAS 88:7978-7982, publicación de la solicitud de patente U.S. 20030186374, y Publicación PCT No. WO 97/29131.

20 La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un individuo inmunizado con RAGE, o una porción de RAGE. Alternativamente, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un individuo naif, es decir, uno que no ha sido inmunizado con RAGE, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un individuo humano que no ha sido inmunizado con RAGE humano. Los anticuerpos de la invención se seleccionan por cribado de la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende RAGE humano para seleccionar de este modo aquellos anticuerpos que reconocen RAGE. Métodos para la realización de dichos cribado y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describe en las referencias del párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tengan afinidades particulares de fijación a hRAGE, tales como aquéllos que se disocian de RAGE humano con una constante de disociación k_{off} particular, pueden utilizarse el método de resonancia de plasmones de superficie conocido en la técnica a fin de seleccionar anticuerpos que tengan la constante de disociación k_{off} deseada. A fin de seleccionar anticuerpos de la invención que tengan una actividad neutralizante particular para h RAGE, tales como aquéllos con una CI_{50} particular, pueden utilizarse métodos estándar conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hRAGE.

35 En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o una porción de fijación de antígeno del mismo, que se fija a RAGE humano. Particularmente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

40 Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden generarse también utilizando diversos métodos de presentación de fago conocidos en la técnica. En los métodos de presentación de fago, se presentan dominios funcionales de anticuerpo en la superficie de partículas de fago, que llevan las secuencias polinucleotídicas que codifican los mismos. En una realización particular, dicho fago puede utilizarse para presentar dominios de fijación de antígeno expresados de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (v.g., humana o murina). Fagos que expresan un dominio de fijación de antígeno que se fija al antígeno de interés pueden seleccionarse o

identificarse con antígeno, v.g., utilizando antígeno marcado o antígeno fijado a o capturado por una superficie sólida o cuenta. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen dominios de fijación fd y M13 expresados por fago con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro, fusionados recombinantemente a la proteína del gen III o el gen VIII del fago. Ejemplos de métodos de presentación de fago que pueden utilizarse para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 1879-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1126; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de Estados Unidos Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780, 225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones codificantes de anticuerpos del fago pueden aislarse y utilizarse para generar anticuerpos enteros que incluyen anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de fijación de antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, con inclusión de células de mamífero, células de insecto, células de plantas, levaduras, y bacterias, v.g., como se describe en detalle más adelante. Por ejemplo, técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ pueden emplearse también utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22.324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); y Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); y Better et al., Science 240:1041-1043 (1988). Ejemplos de técnicas que pueden utilizarse para producir Fvs y anticuerpos monocatenarios incluyen las descritas en las patentes U.S. 4,946,778 y 5,258, 498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988).

Como alternativa al cribado de bibliotecas de anticuerpos recombinantes por presentación de fago, pueden aplicarse otras metodologías conocidas en la técnica para cribado de grandes bibliotecas combinatorias para la identificación de anticuerpos de especificidad dual de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el cual la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones RNA-proteína, como se describe en la publicación PCT No. WO 98/31.700 por Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un mRNA y el péptido o proteína que codifica el mismo por traducción *in vitro* de mRNAs sintéticos que llevan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Así, un mRNA específico puede enriquecerse a partir de una mixtura compleja de mRNAs (v.g., una biblioteca combinatoria) basándose en las propiedades del péptido o proteína codificado, v.g., anticuerpo, o porción del mismo, tales como fijación del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos o porciones de los mismos recuperados por cribado de tales bibliotecas pueden expresarse por medios recombinantes como se ha descrito arriba (v.g. en células hospedadores de mamífero) y, además, pueden someterse a maduración ulterior por afinidad mediante tandas adicionales de cribado de fusiones mRNA-péptido en las cuales se han introducido mutaciones en la o las secuencias seleccionadas originalmente, o por otros métodos para maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente.

En otro enfoque, los anticuerpos de la presente invención pueden generarse también utilizando métodos de presentación de levadura conocidos en la técnica. En los métodos de presentación de levadura, se utilizan métodos

genéticos para ligar dominios de anticuerpo a la pared de la célula de levadura y presentarlos en la superficie de la levadura. En particular, dicha levadura puede utilizarse para presentar dominios de fijación de antígeno expresados por un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (v.g., humana o murina). Ejemplos de métodos de presentación de levadura que pueden utilizarse para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos por Wittrup, et al. Patente de los Estados Unidos No. 6,699,658.

4. Producción de anticuerpos RAGE recombinantes particulares de la invención

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión a partir de células hospedadoras, en la que uno o más vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera es/son transfectedo(s) a una célula hospedadora por técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" debe entenderse que abarcan una gran diversidad de técnicas utilizadas comúnmente para introducción de DNA exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, v.g. electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección DEAE-dextrano y análogos. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucariotas, es preferible la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferible en células hospedadoras de mamífero, dado que tales células eucariotas (y en particular células de mamífero) tienen mayor probabilidad que las células procariotas de ensamblarse y secretar un anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo.

Células hospedadoras particulares de mamífero para expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen las de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (con inclusión de células dhfr- CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, v.g. como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, en particular, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se desarrollan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos estándar de purificación de proteínas.

Pueden utilizarse también células hospedadoras para producir fragmentos de anticuerpo funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se comprenderá que variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con DNA que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. También puede utilizarse tecnología de DNA recombinante para separar algo, o la totalidad, del DNA que codifica una o las dos cadenas ligeras y pesadas que no es/son necesaria(s) para fijación a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de DNA truncadas están abarcadas también por los anticuerpos de la invención. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los cuales una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención, y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés por reticulación de un anticuerpo de la invención a un segundo anticuerpo por métodos estándar de reticulación química.

En un sistema particular para expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica a la vez la cadena pesada del anticuerpo y la

cadena ligera del anticuerpo se introduce en células dhfr-CHO por transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están enlazados cada uno operativamente a elementos reguladores intensificador CMV/promotor AdMLP para impulsar niveles altos de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante lleva también un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector utilizando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, recuperándose el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se utilizan técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Todavía adicionalmente, la invención proporciona un método de síntesis de un anticuerpo recombinante de la invención por cultivo de una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además el aislamiento del anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

4.1 Anticuerpos anti-RAGE

La Tabla 4 es una lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos anti-RAGE particulares como se describen en esta memoria.

Tabla 4: lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos anti-huRAGE

Seq. No.	ID	Región de Proteína	Secuencia
			1234567890123456789012345678901
1		VH 7F9	EEKLEESGGGLVQLGGSMKISCVASGFTLSN YWMD WVRQSPEKGLEWIA EIRLKS NYYSTHY AESVKG RFSISRDDSKGSVSLQMDNLTAEDT GIYFCAR NAYWYFDV WGTGTTVTVSS
		VH 7F9 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO. : 1 NYWMD
		VH 7F9 CDR-H2	Residuos 50-68 de SEQ ID NO. : 1 EIRLKS NYYSTHY AESVKG
		VH 7F9 CDR-H3	Residuos 101-108 de SEQ ID NO. : 1 NAYWYFDV
5		VL 7F9	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSATC KASQDVGT SVA WYQQKLGQSPKLLI WTSTRHT GVPDRF TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC QQYNN YPLT FGDGTKLELKR
		VL 7F9 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO. :5 KASQDVGT SVA
		VL 7F9 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO. :5 WTSTRHT
		VL 7F9 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO. :5 QQYNNYPLT
9		VH 11E6	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFN FGMN WVKQAPGKGLKWMGY INTNTGESIYSE EFKGR FAFSLETSASTAYLQINNLKNETAT YFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS

Seq. ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			1234567890123456789012345678901
	VH 11E6 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:9	NFGMN
	VH 11E6 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:9	YINTNTGESIYSEEFKG
	VH 11E6 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO.:9	SRMVTAYGMDY
13	VL 11E6		DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCK KASQNVGT AVAWYQQRPGQSPKLLIF SASNRYT GVPDRF TGS GSGTDFTLTLSNMQPEDLADYFC QQYSS YPLT FGVGTKLELKR
	VL 11E6 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:13	KASQNVGTAVA
	VL 11E6 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:13	SASNRYT
	VL 11E6 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:13	QQYSSYPLT
17	VH 4E5		QVQLQQSGAELVLRPGTSVKVSCKASGYAFNN YLIEWIKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTHNE KFKV KATLTADKSSSTAYIQLSSLTSDDSAV YFCAR SAGTARARFAY WGQGTTLVTVSA
	VH 4E5 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:17	NYLIE
	VH 4E5 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:17	VINPGSGGTHNEKFKV
	VH 4E5 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO.:17	SAGTARARFAY
21	VL 4E5		DIQMTQSPSSLSASLGERVSLT CRASQDIGS SLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDS GVPKRF SGSRSGSDYSLTISSESEDFVDYY CLQYAS FPFT FGSGTKLEIKR
	VL 4E5 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:21	RASQDIGSSLN
	VL 4E5 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:21	ATSSLDS
	VL 4E5 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:21	LQYASFPFT

Las secuencias CDR de anticuerpos anti-RAGE aislados que anteceden establecen una nueva familia de proteínas de fijación de RAGE, aisladas conforme a esta invención. Para generar y seleccionar CDR' S de la invención que tengan fijación de RAGE y/o actividad particular de neutralización con respecto a hRAGE, pueden utilizarse métodos estándar conocidos en la técnica para generación de proteínas de fijación de la presente invención y evaluación de las características de fijación y/o neutralización de RAGE de dichas proteínas de fijación, incluyendo, pero sin carácter limitante, las descritas específicamente en esta memoria.

4.2 Anticuerpos Quiméricos anti-RAGE

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual porciones diferentes del anticuerpo se derivan de especies animales diferentes, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Pueden utilizarse métodos para producción de

anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase v.g., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; las patentes de Estados Unidos Nos. 5,807,715; 4,816,567 y 4,816,397. Adicionalmente, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) por remodelación de genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón con especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

En una realización, los anticuerpos quiméricos de la invención se producen por reemplazamiento de la región constante de cadena pesada de los anticuerpos anti-RAGE humano monoclonales murinos descritos en esta memoria con una región constante de IgG1 humana.

4.3 Anticuerpos anti-RAGE injertados en CDR

Los anticuerpos injertados en CDR de la invención comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano en el que una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L está(n) reemplazada(s) con secuencias CDR de anticuerpos no humanos, como por ejemplo murinos de la invención. Una secuencia marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para injerto en CDR. Sin embargo, el reemplazamiento directo de cadenas en un marco de este tipo conduce a menudo a cierta pérdida de afinidad de fijación al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, tanto menor es la posibilidad de que la combinación de CDRs murinas con el marco humano introduzca distorsiones en las CDRs que puedan reducir la afinidad. Por tanto, es preferible que el marco variable humano que se elige para reemplazar el marco variable murino aparte de las CDRs tenga al menos un 65% de identidad de secuencia con el marco de la región variable de anticuerpos murinos. Es más preferible que las regiones variables humana y murina aparte de las CDRs tengan al menos 70% de identidad de secuencia. Es aún más preferible que las regiones variables humana y murina aparte de las CDRs tengan al menos 75% de identidad de secuencia. Es muy preferible que las regiones variables humana y murina aparte de las CDRs tengan al menos 80% de identidad de secuencia. Métodos para producción de anticuerpos injertados en CDR se conocen en la técnica ((Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Patentes U.S. Nos. 5,225,539).

En una realización específica, la invención proporciona anticuerpos injertados en CDR con cadenas V_H y/o V_L como se describen en la Tabla 5.

Tabla 5: Anticuerpos injertados en CDR

SEQ ID No.	Región de proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
56	VH 11E6.1-GL	
(43)	(VH7-4.1/JH6 FR1)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWVMGY INTNTGESIY
(44)	(VH7-4.1/JH6 FR2)	SEEFKGR FVFLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTTVTVSS
(45)	(VH7-4.1/JH6 FR3)	

SEQ ID No.	Región de proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
(46)	(VH7-4.1/JH6 FR4)	
57	VH 11E6.2-GL	
(47)	(VH1-2/JH6 FR1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
(44)	(VH1-2/JH6 FR2)	NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY
(48)	(VH1-2/JH6 FR3)	SEEFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDD
(46)	(VH1-2/JH6 FR4)	TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTTVTVSS
58	VL 11E6.1-GL	
(49)	(1-12/L5/JK2 FR1)	DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCK ASQNVG
(50)	(1-12/L5/JK2 FR2)	TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYT GVPS
(51)	(1-12/L5/JK2 FR3)	RFSGSGSGTDFLLTISLQPEDFATYYC QQ
(52)	(1-12/L5/JK2 FR4)	YSSYPLT FGQGTKLEIKR
59	VL 11E6.2-GL	
(53)	(3-15/L2/JK2 FR1)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC ASQNVG
(54)	(3-15/L2/JK2 FR2)	TAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYT GI PA
(55)	(3-15/L2/JK2 FR3)	RFSGSGSGTEFTLLTISLQSEDFAVYYC QQ
(52)	(3-15/L2/JK2 FR4)	YSSYPLT FGQGTKLEIKR

Las secuencias CDR derivadas de mAb 11 E6 se indican en letra negra. Se hace referencia también a las secuencias marco específicas (FR 1 a FR 4) por indicación de los SEQ ID NOs correspondientes (véanse también las Tablas 2 y 3).

5

4.4 Anticuerpos anti-RAGE humanizados

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de anticuerpos de especie no humana que se fijan al antígeno deseado, teniendo una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de una especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Secuencias Ig humanas conocidas se describen, v.g., en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html. www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html ; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-

15

u.acjp/about.yasuhito-/ELISA.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
 www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-
 marburg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/about.jraats/links.html; www.recab.uni-
 hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
 5 www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html;
 antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
 www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;
 www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/;www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
 www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat aim.html;
 10 www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-
 pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of
 Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Tales secuencias importadas pueden utilizarse para
 reducir la inmunogenicidad o reducir, aumentar o modificar la fijación, afinidad, tasa de asociación, tasa de
 disociación, avidez, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.
 15 Residuos marco en las regiones marco humanas pueden sustituirse con el residuo correspondiente del anticuerpo
 donante de la CDR para alterar, particularmente aumentar, la fijación de antígeno. Estas sustituciones marco se
 identifican por métodos muy conocidos en la técnica, v.g., por modelación de las interacciones de la CDR y los
 residuos marco para identificar regiones marco importantes para la fijación de antígeno y comparación de
 secuencias a fin de identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, v.g., Queen et al.,
 20 Patente U.S. No. 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)). Modelos tridimensionales de
 inmunoglobulina están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la técnica. Se dispone de
 programas de computadora que ilustran y presentan estructuras de conformación tridimensionales probables de
 secuencias de inmunoglobulina candidato seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis
 del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidato, es decir, el
 25 análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidato para fijarse a su antígeno. De esta
 manera, pueden seleccionarse residuos FR y combinarse a partir de las secuencias de consenso e importación de
 tal modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad incrementada para el o los
 antígenos diana. En general, los residuos CDR están implicados directa y en la mayoría de los casos
 sustancialmente en influir en la fijación de antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una diversidad
 30 de métodos conocidos en la técnica, tales como pero sin carácter limitante los descritos en Jones et al., Nature
 321:522 (1986); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y
 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J.
 Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein
 Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al. , PNAS 91:969-973 (1994); Publicación PCTWO 91/09967, PCT/
 35 US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755;
 WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, Patentes U.S. NOs.
 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352,
 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567.

40 **5. Realizaciones Adicionales de Anticuerpos de la Invención**

5.1 Anticuerpos de Fusión e Inmunoadhesinas

La presente solicitud describe también un anticuerpo de fusión o inmunoadesina que puede producirse, que comprende la totalidad o una porción de un anticuerpo RAGE de la presente solicitud enlazada a otro polipéptido. En algunas realizaciones, únicamente la región variable del anticuerpo RAGE está enlazada al polipéptido. En otras realizaciones, el dominio VH de un anticuerpo RAGE de esta solicitud está enlazado a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL del anticuerpo está enlazado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera que permite que los dominios VH y VL interactúen uno con otro para formar un sitio de fijación del anticuerpo. En otras realizaciones, el dominio VH está separado del dominio VL por un enlazador que permite que los dominios VH y VL interactúen uno con otro (véase más adelante bajo Anticuerpos Monocatenarios). El anticuerpo VH-enlazador-VL se enlaza luego a un polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o tejido que expresa un RAGE. El polipéptido de interés puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, o puede ser un agente diagnóstico, tal como una enzima, que puede visualizarse fácilmente, tal como peroxidasa de rábano picante. Adicionalmente, pueden crearse anticuerpos de fusión en los cuales dos (o más) anticuerpos monocatenarios están enlazados uno a otro. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente en una sola cadena de polipéptido, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

Una realización proporciona una proteína de fijación marcada en la cual un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente solicitud se derivatiza o se enlaza a otra molécula funcional (v.g., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de fijación marcada de la presente solicitud puede derivarse por enlace funcional de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente solicitud (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares distintas, tales como un ácido nucleico, otro anticuerpo (v.g., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina una etiqueta de polihistidina).

Agentes detectables útiles con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente solicitud incluyen compuestos fluorescentes. Agentes detectables fluorescentes ilustrativos incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y análogos. Un anticuerpo puede derivatizarse también con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa-oxidasa y análogas. Cuando un anticuerpo está derivatizado con una enzima detectable, el mismo se detecta por adición de reactivos adicionales que utiliza la enzima para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo puede estar derivatizado también con un ácido nucleico, biotina, y detectarse por medida indirecta de la fijación de avidina o estreptavidina.

5.2. Anticuerpos Monocatenarios

La presente solicitud incluye un anticuerpo monocatenario (scFv) que se fija a un RAGE inmunógeno de la invención. Para producir el scFv, se enlaza operativamente DNA codificante de VH y V a DNA que codifica un enlazador flexible, v.g., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser), de tal modo que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, v.g., Bird et al. (1988) Science 242:423-42 6; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., 30 Nature (1990) 34 8: 552- 554). El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si se utilizan una sola VH y VL, bivalente, si se utilizan dos VH y VL, o polivalente, si se utilizan más de dos VH y VL. Dos de dichos fragmentos scFv acoplados por un enlazador se conocen como "diacuerpo", forma que está abarcada también por la invención.

5

5.3. Anticuerpos Biespecíficos

La presente solicitud incluye adicionalmente un anticuerpo biespecífico o fragmento de fijación de antígeno del mismo en el cual una especificidad corresponde a un polipéptido RAGE inmunógeno de la presente solicitud. Por ejemplo, puede generarse un anticuerpo biespecífico que se fija específicamente a un polipéptido RAGE inmunógeno de la invención por un dominio de fijación, y a una segunda molécula por un segundo dominio de fijación. Adicionalmente, puede generarse un anticuerpo monocatenario que contiene más de un VH y VL que se fija específicamente a un polipéptido inmunógeno de la invención y a otra molécula que está asociada con la atenuación del colapso del cono de crecimiento mediado por mielina y la inhibición de las excrecencias y brotes de neuritis. Tales anticuerpos biespecíficos pueden generarse utilizando técnicas que son bien conocidas, por ejemplo, Fanger et al. Immunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, 20 (supra).

10

15

20

En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se preparan utilizando una o más de las regiones variables de un anticuerpo de la invención. En otra realización, el anticuerpo biespecífico se prepara utilizando una o más regiones CDR de dicho anticuerpo.

5.4. Anticuerpos Derivatizados y Marcados

Un anticuerpo o un fragmento de fijación de antígeno de la presente solicitud puede derivatizarse o enlazarse a otra molécula (v.g., otro péptido o proteína). En general, el anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno se derivatiza de tal manera que la fijación a un polipéptido inmunógeno de la invención no se ve afectada desfavorablemente por la derivatización o marcación.

25

30

35

40

Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente solicitud puede enlazarse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares distintas, tales como otro anticuerpo (v.g., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un reactivo de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina). Todavía más, un anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo puede ser parte de una molécula mayor de inmunoadhesión, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos distintos o diferentes. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de una región de núcleo de estreptavidina para producir una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para producir moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al. (1994) Molecular Immunology 31:1047-1058). Porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos enteros utilizando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Además, anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse utilizando técnicas estándar de DNA recombinante.

Un anticuerpo derivatizado puede producirse por reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, v.g., para crear anticuerpos biespecíficos). Reticuladores adecuados incluyen aquéllos que son heterobifuncionales, teniendo dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (v.g. éster maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (v.g., suerato de disuccinimidilo). Tales enlazadores están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un anticuerpo derivatizado puede ser también un anticuerpo marcado. Por ejemplo, agentes de detección con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención son compuestos fluorescentes, con inclusión de fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, luminiscentes lantánidos y análogos. Un anticuerpo puede marcarse también con enzimas que son útiles para detección, tales como peroxidasa de rábano picante, galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa-oxidasa y análogas. En realizaciones que están marcadas con una enzima detectable, el anticuerpo se detecta por adición de reactivos adicionales que utiliza la enzima para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, peroxidasa de rábano picante con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina. Un anticuerpo puede marcarse también con biotina, y detectarse por medida indirecta de la fijación de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo puede marcarse también con un epítipo polipeptídico predeterminado reconocido por un informador secundario (v.g., secuencias par de cremalleras de leucina, sitios de fijación para anticuerpos secundarios, dominios de fijación de metales, epítipo: etiquetas). Un anticuerpo RAGE o fragmento antigénico del mismo puede marcarse también con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede utilizarse para propósitos tanto diagnósticos como terapéuticos. El anticuerpo RAGE radiomarcado puede utilizarse diagnósticamente, por ejemplo, para determinar los niveles de receptor de RAGE en un individuo. Adicionalmente, el anticuerpo RAGE radiomarcado puede utilizarse terapéuticamente para tratamiento de una lesión en la médula espinal.

Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin carácter limitante, los radioisótopos o radionucleidos siguientes ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm . un anticuerpo RAGE o un fragmento de antígeno del mismo puede derivatizarse también con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, v.g., para aumentar la semivida en suero o para aumentar la fijación de tejido. Asimismo, un marcador para polipéptidos puede incluir un ácido nucleico, por ejemplo DNA para detección por PCR, o mejora de la expresión génica, o siRNA para reprimir la expresión génica en células o tejidos portadores de RAGE.

La clase y subclase de anticuerpos RAGE pueden determinarse por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo pueden determinarse utilizando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particulares de anticuerpo. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y subclase pueden determinarse por ELISA, Transferencia Western así como otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase pueden determinarse por secuenciación de la totalidad o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparación de sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinación de la clase y subclase de los anticuerpos.

40

5.5. Inmunoglobulinas de Dominio Variable Dual

Las proteínas de fijación o inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD) como se utilizan en esta memoria, son proteínas de fijación que comprenden dos o más sitios de fijación de antígeno y son proteínas de fijación tetravalentes o multivalentes, como por ejemplo bivalentes y tetravalentes. El término "proteína de fijación multivalente" se utiliza en esta memoria descriptiva denotar una proteína de fijación que comprende dos o más sitios de fijación de antígeno. La proteína de fijación multivalente está modificada particularmente por ingeniería genética para tener los dos o más sitios de fijación de antígeno, y por lo general no es un anticuerpo existente naturalmente. El término "proteína de fijación multiespecífica" se refiere a una proteína de fijación capaz de fijar dos o más dianas afines o no afines. Tales DVDs pueden ser monoespecíficos, es decir capaces de fijarse a un solo antígeno o multiespecíficos, es decir capaces de fijarse a dos o más antígenos: A las proteínas de fijación DVD que comprenden 2 polipéptidos DVD de cadena pesada y 2 polipéptidos DVD de cadena ligera se hace referencia como una DVD Ig. Cada mitad de una DVD Ig comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVD de cadena ligera, y 2 sitios de fijación de antígeno. Cada sitio de fijación comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, con un total de 6 CDRs implicadas en fijación de antígeno por cada sitio de fijación de antígeno. Proteínas de fijación DVD y métodos de producción de proteínas de fijación DVD se describen en la Solicitud de Patente U.S. No. 11/507.050, Número de Publicación 2007007 1675. Debe entenderse que la presente invención comprende una proteína de fijación DVD que comprende proteínas de fijación capaces de fijar RAGE. Particularmente, la proteína de fijación DVD es capaz de fijar RAGE y una segunda diana. La segunda diana se selecciona del grupo constituido por actividades anti-inflamatorias mAb ((IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, TNF alfa/ β , IFN- β , gamma, LIF, OSM, CNTF, PF-4, proteína básica de las plaquetas (PBP), NAP-2, β -TG, MIP-1, MCP2/3, RANTES, linfotactina), de proteínas mediadoras de transporte (receptor de insulina, receptor de transferrina, receptor de trombina, receptor de leptina, receptor de LDL), de otros mAbs neuroregenerativos (NgR, Lingo, p75, CSPG (v.g. NG-2, neurocán, brevicán, versicán, aggrecán), ácido hialurónico, mAG, tenascina, NI-35, NI-250, IMP, perlecán, neurocán, phosphacán, nogo-A, OMGP, Sema4D, Sema 3A, efrina B3, efrina A2, efrina A5, MAG, EphA4, anexina B1, TROY, wnts, ryk rec., BMP-2, BMP-4, BMP-7), de actividades neuroprotectoras mAb (EGF, EGFR, Sema 3), de mAbs anti-amiloide β (v.g. m266, 3D6 (bapineuzumab), mAbs anti-globulómeros 7C6), de receptores y transportadores localizados en el CNS (receptores de serotonina, receptores de dopamina, DAT, Asc-1, GlyT1).

5.6. Anticuerpos de Especificidad Dual

La presente solicitud describe también tecnología de "anticuerpos de especificidad dual". Los anticuerpos de especificidad dual pueden servir como agonistas, antagonistas, o ambas cosas en diferentes combinaciones. Los anticuerpos de especificidad dual son anticuerpos en los cuales la cadena VH se fija a un primer antígeno y la cadena VL se fija a otro antígeno, como se ilustra en WO 2008 082 651.

5.7. Anticuerpos Cristalizados

Otra realización de la presente solicitud proporciona una proteína de fijación cristalizada. El término "cristalizado" como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de redes

- tridimensionales regulares repetidas de átomos, iones, moléculas (v.g., proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (v.g., complejos antígeno/anticuerpo). Estas redes tridimensionales están dispuestas conforme a relaciones matemáticas específicas que son bien conocidas en el campo. La vía fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal se conoce como la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica dada bien definida proporciona la "celdilla unidad" del cristal. La repetición de la celdilla unidad por traslaciones regulares en la totalidad de las 3 dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999)."
- 5
- 10 Particularmente, la presente solicitud describe cristales de anticuerpos RAGE enteros y fragmentos de los mismos como se describen en esta memoria, y formulaciones y composiciones que comprenden dichos cristales. En una realización, la proteína de fijación cristalizada tiene una semivida *in vivo* mayor que la contrapartida soluble de la proteína de fijación. En otra realización, la proteína de fijación retiene actividad biológica después de la cristalización.
- 15 Una proteína de fijación cristalizada de la invención puede producirse conforme a métodos conocidos en la técnica y como se describe en WO 0207 26 36.

5.8. Anticuerpos Glicosilados

- 20 Otra realización de la invención proporciona una proteína de fijación glicosilada en la cual el anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo comprende uno o más residuos carbohidrato. La producción de proteínas *in vivo* nacientes puede sufrir procesamiento ulterior, conocido como modificación post-traducciona. En particular, pueden añadirse residuos azúcar (glicosilo) enzimáticamente, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales de oligosacárido enlazadas covalentemente se conocen como proteínas
- 25 glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos carbohidrato en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los residuos carbohidrato en el dominio Fc tienen un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con efecto mínimo sobre la fijación de antígeno o la semivida del anticuerpo (R. Gefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener cierto efecto sobre la actividad de fijación de antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede
- 30 tener un efecto negativo sobre la afinidad de fijación del anticuerpo, debido probablemente a impedimento estérico (Co, M.S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361- 1367), o dan como resultado una mayor afinidad para el antígeno (Wallick, S.C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723).

- Un aspecto de la presente invención está dirigido a la generación de mutantes del sitio de glicosilación en los cuales el sitio de glicosilación unido a O o N de la proteína de fijación ha sido mutado. Un experto en la técnica puede generar mutantes de este tipo utilizando tecnologías estándar bien conocidas. Mutantes del sitio de glicosilación que retienen la actividad biológica pero tienen una actividad de fijación aumentada o disminuida son otro objeto de la presente invención.
- 35

- 40 En otra realización adicional, la glicosilación del anticuerpo o porción de fijación de antígeno de la invención está modificada. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo no glicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden realizarse, por ejemplo, por alteración de uno o más sitios de

glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos, que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar con ello la glicosilación en dicho sitio. Tal glicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe con mayor detalle en la publicación PCT WO 2003016466A2, y las patentes de EE.UU. Nos. 5.714.350 y 6.350.861.

Adicional o alternativamente, puede producirse un anticuerpo modificado de la invención que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNAc bisectoras incrementadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden realizarse mediante, por ejemplo, expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en la técnica y pueden utilizarse como células hospedadoras en las cuales se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como la Patente Europea NO: EP 1, 176,195; y las Publicaciones PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80.

La glicosilación de las proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula hospedadora en la que se expresa la proteína. Organismos diferentes pueden producir enzimas de glicosilación diferentes (v.g., glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen sustratos diferentes (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de las proteínas, y la composición de los residuos glicosilo, pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se expresa la proteína particular. Residuos glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero sin carácter limitante, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico. Particularmente, la proteína de fijación glicosilada comprende residuos glicosilo tales que el patrón de glicosilación es humano.

Es conocido por los expertos en la técnica que la diferente glicosilación de proteínas puede dar como resultado características de proteínas diferentes. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo hospedador, tal como levadura, y glicosilada utilizando el camino endógeno de levadura, puede ser reducida comparada con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como el linaje de células CHO. Tales glicoproteínas pueden ser también inmunógenas en humanos y exhiben semivida reducida *in vivo* después de la administración. Receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosilo específicos y promover el aclaramiento rápido de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de las proteínas, la solubilidad, la susceptibilidad a las proteasas, el tráfico, el transporte, la compartimentalización, la secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, la antigenicidad o la alergenicidad. De acuerdo con ello, un técnico experto puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo composición y patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, a la producida en células humanas o en células específicas de la especie del animal sujeto propuesto.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de la de una célula hospedadora puede conseguirse por modificación genética de la célula hospedadora para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Utilizando métodos conocidos en la técnica, un técnico experto puede generar anticuerpos o porciones de fijación de antígeno

de los mismos que exhiben glicosilación de proteínas humanas. Por ejemplo, se han modificado genéticamente cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación no existentes naturalmente tales que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en esta cepas de levadura exhiben glicosilación de proteínas idéntica a la de células animales, especialmente células humanas (solicitudes de patente U.S. 20040018590 y 20020137134 y publicación PCT WO2005100584 A2).

Adicionalmente, se apreciará por un experto en la técnica que puede expresarse una proteína de interés utilizando una biblioteca de células hospedadoras modificadas por ingeniería genética para expresar diversas enzimas de glicosilación, tales que las células hospedadoras miembro de la biblioteca producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un técnico experto puede seleccionar y aislar luego la proteína de interés con patrones de glicosilación nuevos particulares. En particular, la proteína que tiene un patrón de glicosilación nuevo seleccionado particularmente exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

5.9. Anticuerpos Antiidiotípicos

Además de las proteínas de fijación, la presente invención está dirigida también a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para tales proteínas de fijación de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes singulares asociados generalmente con la región de fijación de antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar por inmunización de un animal con la proteína de fijación o una región que contiene CDR de la misma. El animal inmunizado reconocerá, y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizador, y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id puede utilizarse también como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en otro animal adicional, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id.

6. Usos de los Anticuerpos

Dada su capacidad para fijarse a RAGE humano, los anticuerpos neutralizantes de la presente solicitud, o porciones de los mismos, se pueden utilizar para detectar RAGE humano (v.g., en una muestra biológica, tal como suero o plasma), utilizando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La presente solicitud proporciona un método para detección de RAGE humano en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y detectar el anticuerpo (o porción de anticuerpo) fijado a RAGE humano o anticuerpo (o porción de anticuerpo) no fijado, para detectar de este modo RAGE humano en la muestra biológica. El anticuerpo está marcado directa o indirectamente con una sustancia detectable a fin de facilitar la detección del anticuerpo fijado o no fijado. Sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de grupos prostéticos complejos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm .

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la presente solicitud son particularmente capaces de neutralizar la actividad de RAGE humano tanto *in vitro* como *in vivo*. De acuerdo con ello, tales anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención pueden utilizarse para inhibir la fijación de RAGE a sus ligandos y neutralizar por tanto la actividad resultante.

5

En otra realización, la presente solicitud proporciona un método para reducción de la actividad de RAGE en un individuo, ventajosamente en un individuo que sufre una enfermedad o trastorno en la cual la actividad de RAGE resultante es perjudicial. La presente solicitud proporciona métodos para reducir la actividad de RAGE en un individuo que sufre una enfermedad o trastorno de este tipo, por prevención de la fijación de RAGE a al menos uno de sus ligandos, como globulómeros A β , por el uso de los anticuerpos monoclonales de la presente solicitud. Los anticuerpos de la presente invención, en particular, los anticuerpos humanizados descritos en esta memoria, se pueden administrar a un individuo humano para propósitos terapéuticos. Además, los anticuerpos de la presente solicitud pueden administrarse a un mamífero no humano que expresa un RAGE con el cual el anticuerpo es capaz de fijarse para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. En relación con esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluación de la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (v.g., test de las dosis y transcurros temporales de administración).

Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "un trastorno en el cual la actividad de RAGE es perjudicial", incluye enfermedades y otros trastornos en los cuales se ha demostrado que la presencia de RAGE o su actividad resultante en un individuo que sufre el trastorno es o se sospecha que es responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. De acuerdo con ello, un trastorno en el cual la actividad de RAGE es perjudicial es un trastorno en el cual se espera que la reducción de la actividad de RAGE alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Ejemplos no limitantes de trastornos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención incluyen aquellos trastornos expuestos en la sección siguiente que se refiere a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Está reconocido que RAGE juega un papel importante en la patología asociada con una diversidad de enfermedades que implican enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo que comprende Esclerosis Lateral Amiotrófica, Esclerosis Lateral Amiotrófica, Lesión del Plexo Braquial, Lesión Cerebral, con inclusión de lesión cerebral traumática, Parálisis Cerebral, Ataxia de Friedrich, Guillain Barre, Leucodistrofias, Esclerosis Múltiple, Post Polio, Espina Bífida, Lesión de la Médula Espinal, Atrofia Muscular Espinal, Tumores Medulares, Ictus, Mielitis Transversa, Demencia, Demencia Senil, Deterioro Cognitivo Moderado, Demencia Relacionada con Alzheimer, Corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, Morbo de Parkinson, síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia grave, trauma de nervios, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión agudo, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, nefropatía diabética, sepsis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias afines. Diabetes y complicaciones resultantes como retinopatía diabética, nefropatía, complicaciones vasculares; complicaciones ateroscleróticas, fibrosis pulmonar, cáncer, especialmente melanomas, y otras amiloidosis. (Véanse, por ejemplo, las referencias siguientes: Amiloidosis, cáncer, artritis, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias crónicas y agudas: Schmidt AM et al: J Clin Invest. 2001 Oct;108(7):949-55.; enfermedades cardiovasculares, diabetes, complicaciones diabéticas, Yan SD et al: Eur J Clin Invest. 1997 Mar;27(3):179-81; enfermedades asociadas a priones; Sasaki N et al: Neurosci Lett. 2002 Jun 28;326(2):117-20; vascularitis, nefropatías, retinopatías, y neuropatías: Thornalley PJ.: Int Rev Neurobiol. 2002;50:37-57; enfermedad de Alzheimer: Weldon DT et al:

Geriatrics. 1997 Sep;52 Suppl 2:S13-6; Yan SD et al: Biochim Biophys Acta. 2000 Jul 26;1502(1):145-57; artritis reumatoide, osteoartritis: Drinda S et al: Rheumatol Int. 2004 Mar 26; enfermedad intestinal: Foell D et al: Gut. 2003 Jun;52(6):847-53; esclerosis múltiple: Yan SS et al: Nat Med. 2003 Mar;9(3):287-93; psoriasis: Foell D et al: Rheumatology (Oxford). 2003 Nov;42(11):1383-9 : lupus : Tanji N et al: J Am Soc Nephrol. 2000 Sep;11(9):1656-66; 5 enfermedades autoinmunes generales, sepsis: Liliensiek B et al: J Clin Invest. 2004 Jun;113(11):1641-50; arterioesclerosis y restenosis : Schmidt AM et al: Circ Res. 1999 Mar 19;84(5):489-97).

Asimismo, como se ha expuesto previamente, pueden ser útiles inmunoglobulinas DVD, o anticuerpos de especificidad dual entre uno cualquiera de los compuestos asociados arriba descritos. Tales preparaciones de 10 anticuerpos como se han descrito arriba pueden ser útiles para el tratamiento de dichas enfermedades.

Los anticuerpos de la presente solicitud pueden combinarse también con péptidos que permiten la transferencia trans-membranal para incluir el direccionamiento de proteínas diana intracelulares. Tales secuencias peptídicas pueden incluir, pero sin carácter limitante, TAT, antenapedia, poli-args, y algunos péptidos anti-microbianos: Tales 15 péptidos pueden permitir la transferencia a través de las membranas, con inclusión de membranas plasmáticas celulares, pero también epitelios y membranas endoteliales, con inclusión de la barrera hematoencefálica, la mucosa intestinal, las meninges, y otras.

Un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la presente solicitud puede administrarse también con uno o más agentes 20 terapéuticos de molécula pequeña adicionales útiles en el tratamiento de trastornos en los cuales está implicada la actividad de RAGE como se ha expuesto en los párrafos que anteceden. Debe entenderse que los anticuerpos de la presente solicitud o porción de fijación de antígeno de los mismos pueden utilizarse solos o en combinación con un agente adicional, v.g. un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el especialista experto para su propósito propuesto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica 25 como útil para tratar la enfermedad o afección que se esté tratando por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional puede ser también un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, v.g., un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

7. Composiciones Farmacéuticas

30 La invención proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención son útiles, pero sin carácter limitante, para diagnóstico, detección, o monitorización de un trastorno, en la prevención, tratamiento, gestión, o mejora de un trastorno o uno o 35 más síntomas del mismo, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención para el tratamiento de un trastorno en el cual es perjudicial la actividad de RAGE. Particularmente, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser útiles para o haber sido o estar siendo utilizados actualmente 40 en la prevención, tratamiento, gestión, o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender adicionalmente un portador, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un individuo. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en esta memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y análogos que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y análogos, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias adyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la semivida o eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Diversos sistemas de suministro son conocidos y pueden utilizarse para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevención, gestión, tratamiento, o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, v.g., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptores (véase, verbigracia, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429, 4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro tipo de vector, etc. Métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, administración parenteral (v.g., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y administración mucosal (v.g., rutas intranasal y oral). Adicionalmente, puede emplearse administración pulmonar, v.g., por el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. Véanse, v.g., Patentes U.S. Nos. 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, y 4,880,078; y Publicación PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903. En una realización, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación o una composición de la invención se administra utilizando la tecnología de suministro de fármacos pulmonares Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar, o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier ruta conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de tipo bolus, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (v.g. la mucosa oral, la mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente al área que precisa tratamiento; esto puede hacerse, por ejemplo, y sin carácter limitante, por infusión local, por inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de material poroso o no poroso, co inclusión de membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (v.g., Tisse®), o matrices de colágeno. En una realización, se administra localmente una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de los anticuerpos de la invención al área afectada a un individuo para prevenir, tratar, gestionar, y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra localmente una cantidad eficaz de uno o más

anticuerpos de la invención al área afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (v.g., uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención de un individuo para prevenir, tratar, gestionar, y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

5 En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico puede suministrarse en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una realización, puede utilizarse una bomba para conseguir la liberación controlada o sostenida (véase Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, pueden utilizarse materiales polímeros para conseguir la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase, v.g., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); Patente U.S. No. 5,679,377; Patente U.S. No. 5, 916,597; Patente U.S. No. 5,912,015; Patente U.S. No. 5,989,463; Patente U.S. No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/15154; and Publicación PCT No. WO 99/20253. Ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin carácter limitante, poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil-pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está exento de impurezas lixiviables, es estable al almacenamiento, estéril, y biodegradable. En otra realización adicional, un sistema de liberación controlada o sostenida puede encontrarse en proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, v.g., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, Supra, Vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

25 Los sistemas de liberación controlada se exponen en la revisión realizada por Langer (1990, Science 249: 1597-1533). Cualquier método conocido por un experto en la técnica puede utilizarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase v.g., Patente U.S. No. 4,526, 938, Publicación PCT WO 91/05548, Publicación PCT WO 96/20698, Ning et al. , 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760.

35 En una realización específica, en la que la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, por construcción del mismo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administración del mismo de tal modo que se vuelve intracelular, v.g., por el uso de un vector retroviral (véase Patente U.S. No. 4.980.286), o por inyección directa, o por el uso de bombardeo de micropartículas (v.g., un cañón de genes; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o

agentes de transfección, o por administración del mismo en enlace con un péptido de tipo homeocaja que se sabe entra en el núcleo (véase, v.g., Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el DNA de una célula hospedadora para expresión por recombinación homóloga.

5

Una composición farmacéutica de la invención se formula de modo que sea compatible con su ruta de administración propuesta. Ejemplos de rutas de administración incluyen, pero sin carácter limitante, parenteral, v.g., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (v.g. inhalación), transdérmica (v.g., tópica), transmucosal, y administración rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal, o tópica a seres humanos: Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. En caso necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección.

10

15

Si las composiciones de la invención deben administrarse tópicamente, las composiciones se pueden formular en forma de un ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, spray, aerosol, solución, emulsión, u otra forma bien conocida por los expertos en la técnica. Véase, v.g., Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, ed. 19ª, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, se emplean típicamente formas viscosas a semisólidas o formas sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica particularmente mayor que el agua. Formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas, y análogas que, en caso deseado, se esterilizan o se mezclan con agentes adyuvantes (v.g., conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones, o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, particularmente en combinación con un portador inerte sólido o líquido, está empaquetado en una mixtura con un componente volátil presurizado (v.g. un propelente gaseoso, tal como freón) o en una botella exprimible. Pueden añadirse también humidificadores o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación en caso deseado. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

20

25

30

Si el método de la invención comprende administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en una forma de aerosol, spray, nebulización o en forma de gotas. En particular, agentes profilácticos o terapéuticos para uso conforme a la presente invención pueden suministrarse convenientemente en la forma de una presentación de spray aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (v.g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula que suministre una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (compuestos de, v.g., gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mixtura de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

35

40

Si el método de la invención comprende administración oral, pueden formularse composiciones orales en la forma de tabletas, cápsulas, sellos, cápsulas de gelatina, soluciones, suspensiones, y análogos. Se pueden preparar tabletas o cápsulas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de

fijación (v.g. almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropil-metilcelulosa); cargas (v.g., lactosa, celulosa microcristalina, o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (v.g., estearato de magnesio, talco, o sílice); desintegrantes (v.g., almidón de patata o almidón-glicolato de sodio); o agentes humectantes (v.g. lauril-sulfato de sodio). Las tabletas pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar, pero sin carácter limitante, la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su utilización. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (v.g., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (v.g. lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (v.g., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (v.g., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener también sales tampón, saborizantes, colorantes, y agentes edulcorantes en caso apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse convenientemente para liberación lenta, liberación controlada, o liberación sostenida de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, v.g., por el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente de aerosolización. Véase, v.g. las Patentes U.S. Nos. 6,019, 968, 5,985, 320, 5, 985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, y 4,880,078; y las Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903. En una realización específica, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación, y/o composición de la invención se administra utilizando tecnología de suministro de fármacos pulmonares Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender administración de una composición formulada para administración parenteral por inyección (v.g., de tipo bolus o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria (v.g., en ampollas o en envases multi-dosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden presentar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede encontrarse en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado (v.g., agua estéril exenta de pirógenos) antes de su utilización. Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de tipo depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (v.g. subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales polímeros o hidrófilos adecuados (v.g., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas cambiadoras de iones, o como derivados escasamente solubles (v.g., como una sal escasamente soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

Por regla general, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados unos con otros en forma de dosis unitaria por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado anhidro en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o papelillo que indica la cantidad de agente activo. En el caso en que el modo de administración es infusión, la composición se puede dispensar con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Donde el modo de administración es por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina a fin de que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

En particular, la invención hace posible también que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se envasa en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o papelillo que indica la cantidad de agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se suministra como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado anhidro en un envase herméticamente cerrado y puede reconstituirse (v.g., con agua o solución salina) a la concentración apropiada para administración a un individuo. Particularmente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un envase herméticamente cerrado en una dosis unitaria de al menos 5 mg, más particularmente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 20 mg, al menos 25 mg, al menos 30 mg, al menos 35 mg, al menos 40 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 55 mg, al menos 60 mg, al menos 65 mg, al menos 70 mg, al menos 75 mg, al menos 80 mg, al menos 85 mg, al menos 90 mg, al menos 95 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención deberían administrarse dentro de una semana, particularmente dentro de 5 días, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, o dentro de 1 hora después de su reconstitución. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministra en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado que indica la cantidad y concentración del agente. Particularmente, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente cerrado que contiene al menos 0,25 mg/mL, más particularmente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debería guardarse a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C en su envase original.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Particularmente, el anticuerpo o las porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/mL de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta de un líquido o forma de dosificación liofilizada en un vial de sílex o ámbar, ampolla o jeringuilla previamente llenada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH de 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Puede utilizarse cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sacarosa (óptimamente 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Pueden incluirse agentes de aumento de volumen para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% manitol (óptimamente 2-4%). Pueden utilizarse estabilizadores en formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas, principalmente 1-50 mmol de L-metionina (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes de aumento de volumen adecuados incluyen glicina, arginina, y

pueden incluirse como 0-0,5% polisorbato-80 (óptimamente 0,005-0,01%). Surfactantes adicionales incluyen, pero sin carácter limitante, polisorbato 20 y surfactantes BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención preparada como una solución inyectable para administración parenteral, puede comprender adicionalmente un agente útil como adyuvante, tal como los utilizados para aumentar la absorción, o dispersión de una proteína terapéutica (v.g., anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de administración parenteral, en particular administración subcutánea. La misma permite también un volumen mayor en el sitio de inyección (es decir, mayor que 1 mL, con menos dolor e incomodidad, e incidencia mínima de reacciones en el sitio de inyección (véase WO 2004078140, US 2006104968).

Las composiciones de esta invención pueden encontrarse en una diversidad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (v.g. soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, bolus, liposomas y supositorios. La forma particular depende del modo de administración y la medicación terapéutica propuestos. Composiciones típicas particulares se encuentran en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. Un modo particular de administración es el parenteral (v.g., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización particular, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización particular, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas deben ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles por incorporación del compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes arriba enumerados, según sea requerido, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan por incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los arriba enumerados. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, métodos particulares de preparación son secado a vacío y spray-secado que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de surfactantes. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede realizarse por inclusión, en la composición, de un agente retardador de la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la presente invención se pueden administrar por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, una ruta/modo de administración particular es la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como será apreciado por el profesional experto, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, con inclusión de implantes, parches transdérmicos, y dispositivos de suministro microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y

biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos generalmente por los expertos en la técnica. Véase, v.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ED., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

5

En ciertas realizaciones, puede administrarse por vía oral un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención, por ejemplo, como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, en caso deseado) pueden confinarse también en una cápsula de gelatina con envoltura dura o blanda, comprimirse en tabletas, o incorporarse directamente en la dieta del individuo. Para administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y utilizarse en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y análogos. Para administrar un compuesto de la invención por administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto con un material a fin de prevenir su desactivación.

10

15

Compuestos activos suplementarios pueden incorporarse también en las composiciones. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se coformula con y/o se coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratamiento de trastornos en los cuales es perjudicial la actividad de RAGE. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-RAGE de la invención puede coformularse y/o coadministrarse con uno o más anticuerpos adicionales que se fijan a otras dianas (v.g., anticuerpos que se fijan a citosinas o que se fijan a moléculas de la superficie celular). Adicionalmente, uno o más anticuerpos de la invención pueden utilizarse en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos que anteceden. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando con ello posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

20

25

En ciertas realizaciones, un anticuerpo para RAGE o fragmento del mismo se enlaza a un vehículo que prolonga la semivida conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero sin carácter limitante, el dominio Fc, polietilenglicol, y dextrano. Tales vehículos se describen, v.g., en la Solicitud U.S. No. de Serie 09/428082 (otorgado como US 6.660.843) y el documento publicado WO 00/24782 (Solicitud No. PCT/US99/25044).

30

En una realización específica, se administran secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención para tratar, prevenir, gestionar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo por terapia génica. La terapia génica se refiere a terapia realizada por la administración a un individuo de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico de la invención que media un efecto profiláctico o terapéutico.

35

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica puede utilizarse conforme a la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de DNA recombinante que pueden utilizarse se describen en Ausubel et al. (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*,

40

John Wiley & Sons, NY (1993); and Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). En US 2005 0042664A1 se hace una descripción detallada de diversos métodos de terapia génica

5 RAGE juega un papel crítico en la patología asociada por una diversidad de enfermedades como se define anteriormente en esta memoria. La infusión de péptidos de amiloide A β en animales conduce a respuestas como respuestas inflamatorias en "arteriolose", disminución en el flujo sanguíneo cerebral. Estos efectos podrían prevenirse por anticuerpos contra RAGE (Rhodin, J. et al. World Congress for Microcirculation, submitted Papers, 7th, Sydney, Australia, Aug. 19-22, 2001 ,543-547; Deane et al. Nature med. 2003).

10 RAGE está regulado en sentido creciente en la microvasculatura de los pacientes de AD y en ratones transgénicos en los cuales el gen de APP humano ha sido sobreexpresado (Deane et al., Nature Med. 2003). Utilizando ratones doblemente transgénicos en los que el gen de APP humano se expresa y RAGE está sobreexpresado, se demostró que la sobreexpresión del gen RAGE normal conduce a deterioro en el aprendizaje y aumento de placas, mientras que la sobreexpresión de una variante de RAGE deficiente en señalización y dominante negativa conduce a mejora
 15 en el aprendizaje y niveles menores de placas (Arancio et al. 2004 EMBO J. 2004). La experimentación en modelos animales de diabetes de ambos tipos 1 y 2 revela que el antagonismo del eje ligando-RAGE reprime el desarrollo y la progresión de la perturbación de células vasculares e inflamatorias en el medio diabético, v.g. ratones RAGE desactivados y anticuerpos Anti-RAGE se han utilizado para demostrar una mejora en modelos animales para, v.g. la retinopatía diabética (Ravichandran R. et al CANADIAN JOURNAL OF DIABETES. 2006; 30(4):422, Myint Khin et al. Diabetes (2006), 55(9), 2510; De-Vriese et al. Journal of the American Society of Nephrology 2003, 14/8, 2109, Jensen et al. Renal effects of a neutralising RAGE-antibody in long-term streptozotocin-diabetic mice. The Journal of endocrinology, 2006, 188, 493). Los efectos renales positivos a largo plazo de un anticuerpo RAGE neutralizante en ratones diabéticos obesos tipo 2 fueron demostrados por Flyvbjerg et al (Diabetes, 2004, 53, 1, p. 166-72). Se utilizaron ratones RAGE desactivados para demostrar una implicación de RAGE en la sepsis (Birgit Liliensiek et al. J
 20 Clin Invest. 2004 June 1; 113(11): 1641-1650; Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response). El bloqueo de fragmentos F(ab)₂ derivados de IgG anti-RAGE reduce la respuesta inflamatoria en la EAE inducida por MOG o BMP (Yan, S.S., et al. 2003. Nat. Med. 9: 287-293). La implicación de RAGE en el cáncer fue demostrada (Abe-R et al. Journal of Investigative Dermatology, 2004, 122/2 (461-467). En ratones portadores de tumores, las tasas de supervivencia se prolongaron, y las metástasis pulmonares espontáneas fueron inhibidas por el tratamiento utilizando anticuerpos neutralizantes anti-RAGE.
 30

Los anticuerpos, y porciones de anticuerpos de la invención pueden utilizarse para tratar humanos que padecen enfermedades de este tipo.

35 Debe entenderse que los anticuerpos de la invención o porción de fijación de antígeno de los mismos pueden utilizarse solos o en combinación con un agente adicional, v.g., un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el profesional experto para su propósito propuesto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico bien conocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o afección que es tratada por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional puede ser también un agente que imparte un atributo
 40 beneficioso a la composición terapéutica, v.g., un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

Debe entenderse adicionalmente las combinaciones que están incluidas dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para su propósito propuesto. Los agentes indicados más adelante son ilustrativos para los

propósitos y no deben considerarse limitados. Las composiciones, que forman parte de la invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas que siguen. La combinación puede incluir también más de un agente adicional, v.g. dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función propuesta.

5 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple con los cuales un anticuerpo, o porción de anticuerpo de la invención puede combinarse incluye los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclofosforina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanicina; interferón- β 1a (AVONEX; Biogén); interferón- β 1b (BETASERON; Chron/bernex); interferón- α -n3 (Interferón Sciences/Fujimoto),
 10 interferón- α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), peginterferón α 2b (Enzon/Schering-Proug), Copolymer 1 (Op-1; COMPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos para antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de fijación de antígeno de los
 15 mismos, pueden combinarse con anticuerpos para moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de fijación de antígeno de los mismos, pueden combinarse también con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato, mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina,
 20 agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α o IL-1 (v.g. inhibidores de las quinasas IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de TACE, inhibidores de señalización de las células T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptapurinas, inhibidores de la enzima convertidora de las angiotensinas, receptores de citocinas solubles y
 25 derivados de los mismos (v.g., receptores de TNF M55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citocinas antiinflamatorias (v.g. IL-4, IL-10, IL-13 y TGF β).

Ejemplos particulares de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple en los cuales el anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo puede combinarse incluyen interferón- β , por ejemplo, IFN β 1a e IFN β 1b; copaxona,
 30 corticosteroides, inhibidores de caspasas, por ejemplo inhibidores de caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos para el ligando CD40 y CD80.

Particularmente, las proteínas de fijación y anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para tratar una amiloidosis, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. Debe entenderse que las proteínas de
 35 fijación y anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con al menos un agente adicional adecuado para tratar una de las enfermedades anteriores. Dicho al menos un agente adicional puede ser seleccionado por el profesional experto para su propósito propuesto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico tal como un inhibidor de colesteroles (v.g., tacrina, donepezil, rivastigmina o galantamina), un bloqueador parcial del receptor NMDA (v.g., memantina), un mimético de glicosaminoglicano (v.g., Alzhemed), un
 40 inhibidor del modulador alostérico de gamma-secretasa (v.g., R-flurbiprofeno), un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina bloqueador de la hormona luteinizante (v.g., leuprorelina), un antagonista del receptor 5-HT1A de serotonina, un agente quelante, un bloqueador selectivo neuronal de los canales de calcio tipo L, un inmunomodulador, un inhibidor de la fibrillogénesis amiloide o inhibidor de la deposición de proteína amiloide (v.g.,

M266), otro anticuerpo (v.g., bapineuzumab), un antagonista del receptor 5-HT1a, un inhibidor de PDE4, un agonista de histamina, una proteína receptora para productos finales de la glicación avanzada, un estimulador de PARP, un antagonista del receptor 6 de serotonina, un agonista del receptor 5-HT4, un esteroide humano, un estimulante de la absorción de glucosa que mejora el metabolismo neuronal, un antagonista selectivo de CB1, un agonista parcial de los receptores de benzodiazepina, un antagonista o inhibidor de la producción de amiloide β , un inhibidor de la deposición de amiloide β , un antagonista parcial de NNR α -7, un agente terapéutico direccionado a PDE4, un inhibidor de la traducción de RNA, un agonista muscarínico, un agonista del receptor de factores de crecimiento de los nervios, un agonista del receptor NGF y un modulador de terapia génica (es decir, aquellos agentes reconocidos actualmente, o que se reconozcan en el futuro, como útiles para tratar la enfermedad o afección que es tratada por el anticuerpo o la proteína de fijación de la presente invención. El agente adicional puede ser también un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, v.g., un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de fijación de antígeno de los mismos, pueden combinarse también con agentes, tales como alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, hidrocloreto de saliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, α -inmunocina NNSO3, ABR-215062, Anergix.MS, antagonistas de los receptores de quimiocinas, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista cannabinoide) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo receptor anti-IL-6, neurovax, pifenidona alotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimitida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas del interferón gamma, agonistas de IL-4.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, en dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo puede ser determinada por una persona experta en la técnica y puede variar conforme a factores tales como estado de enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la cual cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo, o porción de anticuerpo, son contrarrestados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, en las dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que una dosis profiláctica se utiliza en los individuos antes de o en una etapa posterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (v.g., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un bolus simple, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza en esta memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los individuos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico

requerido. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención viene dictada por y es directamente dependiente de (a) las características singulares del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.

5 Un intervalo ilustrativo y no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,1-20 mg/kg, más particularmente 1-10 mg/kg. Debe indicarse que los valores de dosis pueden variar por el tipo y la gravedad de la condición a aliviar. Debe indicarse que para cualquier individuo particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación indicados en esta memoria son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

15 Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención descritos en esta memoria son obvias y pueden hacerse utilizando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o las realizaciones descritas en esta memoria. Una vez descrita la presente invención en detalle, la misma será comprendida más claramente haciendo referencia a los ejemplos que siguen, que se incluyen únicamente para propósitos de ilustración y no pretenden ser limitantes de la invención.

20 **PARTE EXPERIMENTAL**

Ejemplo 1: Anticuerpos anti-huRAGE preferidos

1.1. Producción de hibridomas y anticuerpos

25 Ratones Balb/c y A/J, de 4-6 semanas de edad, se inmunizaron y reforzaron subcutáneamente con RAGE humano. Los animales se inyectaron cada 3 semanas, comenzando con una inyección primaria de 30 µg en adyuvante de Freund completo e inyecciones de refuerzo de 30 µg en adyuvante de Freund incompleto. Los ratones seleccionados para fusión se inyectaron por vía intravenosa con 10 µg de hRAGE en solución salina, 4 días antes de la fusión. Se extirparon los bazo de los animales inmunizados y se prepararon suspensiones de células simples. 30 Las células de mieloma SP2/0 se cosecharon del cultivo y se lavaron. Las células de bazo y células de tumor se mezclaron en una ratio de 5:1 y se fusionaron utilizando 50% PEG 3000 utilizando técnicas estándar (Kohler y Milstein, 1975). Las células fusionadas se sembraron en placas de 96 pocillos en medio selectivo, a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células de bazo por pocillo. Las fusiones se incubaron a 37°C durante 7-10 días. Cuando se observaron colonias macroscópicas, se retiraron los sobrenadantes y se testaron en el ELISA hRAGE. 35

Los hibridomas que producían mAbs con características deseadas se subclonaron por el método de dilución limitante. Los sobrenadantes que contenían subclones se ensayaron respecto a fijación a hRAGE por ELISA. Las subclases de cadena pesada y ligera de los mAbs se determinaron utilizando el kit de determinación del isotipo 40 Zymed EIA.

1.2. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la región variable para cada mAb anti-RAGE humano de murino

Para cada determinación de la secuencia de aminoácidos, aproximadamente 10×10^6 células del hibridoma se aislaron por centrifugación y se procesaron para aislar RNA total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, CA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total se sometió a síntesis del DNA de la primera cadena utilizando el Sistema de Síntesis de la Primera Cadena SuperScript (Invitrogen, CA) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó oligo(dT) para cebar la síntesis de la primera cadena a fin de seleccionar el RNA poli(A)⁺. El producto de cDNA de la primera cadena se amplificó luego por PCR con cebadores diseñados para amplificación de las regiones variables de inmunoglobulina murinas (Ig-Primer Sets, Novagen, WI). Los productos PCR se resolvieron en un gel de agarosa, se escindieron, se purificaron, y se subclonaron luego con el kit de Clonación TOPO en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, CA) y se transformaron en *E. coli* químicamente competente TOP10 (Invitrogen, CA). Se realizó una PCR de las colonias en los transformantes para identificar clones que contenían la inserción. Se aisló DNA plasmídico de los clones que contenían la inserción utilizando un kit QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). Las inserciones en los plásmidos se secuenciaron en ambas cadenas para determinar las secuencias de DNA de la cadena pesada variable o ligera variable utilizando cebadores directo M13 e inverso M13 (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Las secuencias de cadena pesada variable y cadena ligera variable de los tres anticuerpos monoclonales 7F9, 11E6 y 4E5 en sus tres CDRs de cadena pesada variable y tres CDRs de cadena ligera variable se enumeran en la Tabla 4 anterior.

1.3. Construcción y expresión de anticuerpos anti-RAGE humano

El DNA codificante de la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales RAGE anti-humanos 7F9, 11E6 y 4E5 se reemplazó por un fragmento de cDNA que codificaba la región constante de IgG1 humana por recombinación homóloga en bacterias. La región constante de la cadena ligera de cada uno de estos anticuerpos se reemplazó por una región constante kappa humana (Tabla 1, arriba). Los anticuerpos quiméricos de longitud total se expresaron transitoriamente en células COS o células 293 por co-transfección de cDNAs de cadena pesada y ligera quiméricas ligados en el plásmido de expresión pBOS o pTT3 (Mizushima y Nagata, Nucleic Acids Research 1990, vol 18, pg 5322). Los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpo quimérico recombinante se purificaron por cromatografía de proteína A Sepharose y el anticuerpo fijado se eluyó por adición de tampón ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se dializaron en PBS.

1.4. Fijación ELISA de mAbs anti-RAGE humano y de mAbs anti-RAGE humano derivados de hibridoma

Los anticuerpos monoclonales anti-RAGE humano quiméricos purificados se testaron en cuanto a su capacidad para fijar RAGE humano en un ELISA de competición. Anticuerpos monoclonales anti-RAGE humano quiméricos recombinantes o anticuerpos monoclonales anti-RAGE humano derivados de hibridoma se diluyeron en PBST + 10% Superblock (Pierce Biotech, Rockford, IL) y se prepararon como un stock 2x a diversas concentraciones que comprendían desde 320 $\mu\text{g/mL}$ a 0,0156 $\mu\text{g/mL}$ (7 F9 y 11E6) y desde 160 $\mu\text{g/mL}$ a 0,0078 $\mu\text{g/mL}$ (4E5). Los anticuerpos monoclonales anti-RAGE humano biotinilados derivados de hibridoma (7F9-biotina, 11E6-biotina y 4E5-biotina) se prepararon a 8 $\mu\text{g/mL}$ en PBST + 10% Superblock. Se mezclaron volúmenes iguales (50 μL) de cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-RAGE humano quiméricos recombinantes o anticuerpos monoclonales anti-RAGE humano derivados de hibridoma y cada uno de los mAbs anti-RAGE derivados de hibridoma y biotinilados correspondientes. Se añadieron luego 50 μL de esta mezcla a placas ELISA previamente recubiertas con RAGE humano recombinante a 2 $\mu\text{g/mL}$ y se incubaron durante 1,5 horas a la temperatura ambiente. Los pocillos se

lavarón 3 veces con PBST + 0,05% Tween-20. Se diluyó estreptavidina HRP (1 mg/mL) en ratio 1:16.000 en PBST + 10% Superblock; se añadieron 50 L/pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces las placas con PBS + 0,05% Tween-20. Se añadieron 50 µL de solución TMB (Sigma, St. Louis, MO) a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró por adición de ácido sulfúrico 1 N. Las placas se leyeron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se muestran en las Figuras 1A, 1B, y 1C.

Ejemplo 2: Generación de sRAGE humano recombinante (husRAGE)

Se expresó la proteína husRAGE recombinante 293/6.1 sRAGE his6 y se purificó en células HEK293 (ATCC CRL-1573). El vector de expresión utilizado para la generación de la expresión estable era "pcDNA3 (-) 6.1C HIS A".

Se utilizaron técnicas estándar de biología molecular conforme a Sambrook y Russel (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001). El RNA total procedente de linfocitos humanos (PBL) se sometió a transcripción inversa en cDNA utilizando el sistema SuperScript RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA). Utilizando los cebadores oligonucleotídicos RAGE-SE: CCG AAT TCC GGA AGC AGG ATG GCA GCC G (SEQ ID NO: 81) y RAGE-AS: CCC TCG AGC CCC TCA AGG CCC TCA GTA CTA CT (SEQ ID NO: 82), se amplificó el cDNA de RAGE a partir del cDNA (arriba obtenido) produciéndose el cDNA de RAGE como se describe en la secuencia de referencia NM-001136. El fragmento PCR se pasó en un gel de agarosa, se purificó y se extrajo con el kit QIAquick Gelextraction (Qiagen GmbH, Alemania). Después de ello, se cortó el cDNA con las endonucleasas de restricción EcoR1 y XhoI. El fragmento resultante se purificó en gel y se ligó al vector pcDNA3 (Invitrogen, USA) que se había cortado previamente con XhoI/EcoR1. Después de transformación en células azules E. coli XL-1 (Invitrogen, USA) se identificó un clon recombinante positivo. La secuencia de este clon se verificó y el DNA plasmídico pcDNA3/RAGE2.6 se aisló utilizando un mini-kit de plásmido (Qiagen, Alemania). El gen codificante para la parte extracelular de RAGE, husRAGE, se amplificó por pcDNA3/RAGE2.6 utilizando PCR y los cebadores N-SE A: AGT AAC GGC CGC CAG TGT GCT GGA ATT CGG A (SEQ ID NO: 83) and C-SE B: CCG GTA CCA CCT GCA GTT GGC CCC TCC TCG CC (SEQ ID NO: 84). El producto PCR resultante se cortó con las endonucleasas de restricción EcoR1 y Kpn1, se purificó en gel como se describe arriba y se ligó en "pcDNA3.1 (-) Myc HIS" (Invitrogen, USA) que se había cortado previamente con EcoR1/Kpn1. El plásmido resultante "pcDNA3 (-) 6.1 C HIS" se transfectó en células HEK 293 utilizando Superfect (Qiagen, Alemania) conforme a las instrucciones de los fabricantes. La selección de células resistentes se realizó utilizando 800 µg/mL G418 en medio MEM (#M4528, Sigma, Alemania) + 10% FCS, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina/estreptavidina (Invitrogen, USA). La clonación de células simples por diluciones seriadas de suspensiones de células condujo a la identificación de un clon "293/6.1 s RAGE His6" que secretaba husRAGE en el medio de cultivo de células como se confirmó por Transferencia Western utilizando un anticuerpo específico de RAGE (Santa Cruz; #sc5563). Para expresión y purificación de cantidades suficiente de la proteína husRAGE, este clon se dejó crecer en medio de cultivo de células que contenía suero (véase arriba) en factorías de células (Nunc, Alemania). Las células se cambiaron luego a medio exento de suero Pro293a-CDM (#12-764Q, BioWhittaker, Bélgica) y se incubaron durante 3 días a 37°C. Se cosecharon 80 litros de medio exento de células y se concentraron utilizando columnas Hemoflow F-Series High-Flux (Fresenius Medical Care AG, Alemania) hasta un volumen de 1400 mL.

La purificación de las proteínas se realizó utilizando cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) por Diarect AG (Freiburg, Alemania) y Sepharose FFF para quelación (Amersam-Bioscience, Suecia). La

equilibración de la columna y fijación de la proteína que contenía hexa-His de los sobrenadantes de células a la matriz se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La elución de la proteína se realizó utilizando gradientes escalonados con concentraciones crecientes de imidazol. Las fracciones eluidas se analizaron respecto a proteína que contenía hexa-His utilizando Transferencias Western y anticuerpos anti-HIS. El hus-RAGE purificado se eluía específicamente a imidazol 250-500 mM. Las fracciones positivas se combinaron, concentraron y dializaron 3 veces contra PBS (2 x 4 h, 1 x 16 h).

Se generó una versión acortada en el terminal N de hus-RAGE (102-331-sRAGE-HIS) que carecía de los 101 primeros aminoácidos de RAGE humano por técnicas estándar en biología molecular como se ha descrito arriba para la proteína hus-RAGE. Esta proteína se generó por el mismo procedimiento básico utilizado para hus-RAGE (1-331). Utilizando el plásmido arriba descrito (pcDNA3/RAGE2.6) y dos cebadores (CGA AGC TTG ATG AAC AGG AAT GGA AAG GAG ACC AAG (SEQ ID NO: 85) and TCC TCG AGC ACC TGC AGT TGG CCC CTC GCC T (SEQ ID NO: 86)), la versión más corta del DNA para hus-RAGE se amplificó por PCR. Después del gel de agarosa y elución del fragmento, el fragmento puro resultante se escindió con endonucleasas de restricción HindIII y XhoI y se purificó de nuevo utilizando gel de agarosa y elución. El fragmento se ligó a psecTAG 2A (Invitrogen, USA) que se cortó primeramente con las endonucleasas de restricción HindIII y XhoI. Después de transformación en células E. coli "TOP10 One Shot" (Invitrogen, USA) se seleccionó un clon positivo y se aisló el DNA plasmídico. El DNA en el vector de expresión se transfeció en células HEK293F utilizando el sistema de expresión Freestyle (Invitrogen, USA). Después de 96 horas de expresión, el sobrenadante exento de células se utilizó para la purificación utilizando cuentas Ni-NTA Superflow (Qiagen, Alemania). La equilibración y la fijación se realizaron conforme a las instrucciones del fabricante. La proteína fijada se eluyó en tampón (PBS, NaCl 160 mM, imidazol 150 mM, pH 8,0). Las fracciones que contenían proteína se combinaron y dializaron durante una noche a 4°C contra TBS (solución salina tamponada con Tris, pH 7,4). Las concentraciones de husRAGE purificado (102-331) se determinaron espectrofotométricamente.

Una versión acortada en el terminal C de la proteína de fusión husRAGE (1-130-sRAGE-Fc) que carecía de los aminoácidos siguientes al aminoácido 130 de RAGE humano se generó por técnicas estándar de biología molecular como se ha descrito arriba para la proteína husRAGE. Utilizando el plásmido arriba descrito (pcDNA3/RAGE2, 6) y dos cebadores (GCACCATGGCAGCCGGAACAGCAGTTG (SEQ ID NO: 87) y GAGTCTCGAGGCAGAATCTACAATTTCTG (SEQ ID NO: 88)), la versión más corta del DNA para husRAGE se amplificó por PCR. Después de gel de agarosa y elución del fragmento, el fragmento puro resultante se escindió con las endonucleasas de restricción NcoI y XhoI y se purificó de nuevo utilizando gel de agarosa y elución. El fragmento se ligó luego en el plásmido pENTR4 que se cortó previamente con las endonucleasas de restricción NcoI y XhoI. Las mezclas de ligación se transformaron en células E. coli "TOP10 One Shot" (Invitrogen, USA) para generar pENTR4-RAGE1-130. Se seleccionó un clon positivo y se aisló el DNA plasmídico. Utilizando recombinación específica del sitio y el sistema de clonación Gateway (Invitrogen, Carlsbad, USA); attL x attR con DNA del clon pENTR4 hRAGE 130 y DNA del vector pcDNA3.1 (+) Zeo hlgG lambda 257-Stop se construyó un plásmido (véase más adelante) que, después de transformación en células "TOP10 One Shot" (Invitrogen, USA) y purificación codificaba husRAGE-1-130-Fc (plásmido denominado: pEXP hRAGE 1-130/hlgG lambda hc 257-Stop). La expresión de este plásmido utilizando el sistema de expresión Freestyle y células 293F (Ejemplo 2.1) y purificación de la proteína resultante a partir del sobrenadante de células utilizando cuentas de proteína G (ejemplo 2.2) dio como resultado una proteína con pureza > 95%.

Ejemplo 3: Construcción de pcDNA3.1(+)-Zero hlgG Lambda hc257-Stop

Se utilizaron dos cebadores oligonucleotídicos (gtacgatatcgagggacgaatggatccaccgtgccagcacc (SEQ ID NO: 91); ctagtctagatcatttaccggagacagggag (SEQ ID NO: 92)) para amplificar la secuencia de DNA para la cadena pesada de hlgG lambda a partir de una biblioteca de cDNA de placenta humana (Clontech #HL5014a) utilizando EasyA Polimerasa en una PCR, reacción en cadena de polimerasa. El DNA resultante se purificó en gel (como se ha descrito arriba), se clonó en un vector pcDNA3.1 V5-His TOPO (pcDNA3.1/V5/His TOPO TA Expression Kit Invitrogen #K4800-01) utilizando las instrucciones del fabricante y se transformó en células TOP10 de E. coli como se ha descrito arriba. Los clones positivos se identificaron y el DNA plasmídico resultante se purificó (designado: pcDNA3.1 (V5His) FC/hlgG lambda hc Nr.2/7) utilizando PCR y cebadores oligonucleotídicos (gtacgatatcgagggacgaatggatccaccgtgccagcacc (SEQ ID NO: 93); ctagtctagatcatttaccggagacagggag (SEQ ID NO: 94)). La parte de hlgG lambda hc del DNA se amplificó, se cortó con EcoRV/XbaI, se ligó a un vector de DNA EcoRV/XbaI precurtido pcDNA3.1 (+) Zeo y se transformó en células E. coli TOP10. El plásmido resultante se designó: pcDNA3.1 (+) Zeo hlgG lambda hc 257-Stop y se utilizó para trabajo ulterior a fin de expresar proteínas fusionadas en el terminal N en marco a una parte C-terminal de cadenas pesadas de inmunoglobulina IgG.

3.1. Transfección y expresión de proteínas en células HEK293F

Células HEK293F que se habían dejado crecer en cultivo durante 2-3 días en Medio de Expresión Free Style 293 se centrifugaron a 400 g y se desechó el sobrenadante. El sedimento de células se resuspendió en medio y se ajustó a 3×10^7 células en 28 mL de medio fresco, se transfirió a un Erlenmeyer de 125 mL y se incubó en una incubadora a 37°C, 8% CO₂ en un agitador de sacudidas orbital a 150 rpm hasta que se preparó la mixtura de transfección.

Las mixturas de transfección con el complejo 293 Fectin-DNA se ajustaron como sigue:

- (i) se diluyeron 30 µg de DNA con Opti-Mem I a un volumen total de 1000 µL (control 1000 µL de Opti-MemI) y se mezclaron;
- (ii) 35 µL de 293 Fectin Invitrogen #12347-019; 1 mL) se diluyeron con Opti-MemI a un volumen total de 1000 µL, se mezclaron y se incubaron durante 5 min a la temperatura ambiente.

La mixtura de DNA y la solución de 293 Fectin de (i) y (ii) se transfirieron a un tubo nuevo, se mezclaron ligeramente y después de incubación durante 25 minutos a la temperatura ambiente se añadieron a las células en el Erlenmeyer.

Las células se incubaron con esta mixtura de transfección durante el tiempo indicado en una incubadora a 37°C, 8% CO₂ en un agitador de sacudidas orbital a 150 rpm. Los sobrenadantes de las células se cosecharon por centrifugación a 400 g durante 10 minutos.

3.2. Purificación de las proteínas de fusión RAGE-Fc utilizando proteína G-Sepharose

Para acoplar la proteína de los sobrenadantes de células a cuentas, se lavaron 3 veces cuentas (proteína G-Sepharose 4 FastFlow (Amersham Biosciences) en PBS por suspensión de las cuentas en PBS y centrifugación a 13500 rpm, desechando el sobrenadante. Las cuentas se incubaron con los sobrenadantes de células respectivos (300 mL de sobrenadantes de células por mL de cuentas) a acoplar durante 1-2 horas en un rotor a la temperatura

ambiente. Se lavaron las cuentas tres veces con PBS y se incubaron con los sobrenadantes de células durante 12 horas o durante una noche a 4°C. Después de la incubación, las cuentas se lavaron tres veces con PBS como anteriormente. La proteína fijada se eluyó por adición de 200 µL de NaCl 140 mM + glicina 0,1 M al sedimento de cuentas e incubación durante 30 minutos en un rotor. Después de centrifugación, el sobrenadante se neutralizó inmediatamente por adición de Tris 2 M para ajustar el pH a 7,1-pH 7,4. El sedimento de cuentas se desechó. Las sondas obtenidas se dializaron contra PBS y se guardaron congeladas en partes alícuotas a -20°C. La proteína de fusión RAGE-Fc que contenía el ectodominio extracelular entero de RAGE se obtuvo de R&D Systems (No. 1145-RG; Quimera RAGE-Fc Humano Recombinante).

5
10 3.3. Fijación por hibridación puntual de anticuerpos a péptidos o fragmentos de RAGE en una forma no desnaturalizada

Se utilizaron hibridaciones puntuales para evaluar la fijación de anticuerpos a péptidos o fragmentos de RAGE en una forma no desnaturalizada. Las proteínas utilizadas eran sRAGE-proteína (1-331 sRAGE-HIS) o una versión acortada en el terminal N (102-331-sRAGE-HIS). Los péptidos se ordenaron y sintetizaron por Biotrend de acuerdo con métodos estándar (síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador AMS 222 utilizando química Fmoc/tBu) que contenía un término carboxilo libre. Los péptidos se purificaron por HPLC y se realizó el análisis de cada péptido respecto a pureza utilizando RP-HPLC. Todos los péptidos tenían una pureza superior a 80%. Las identidades de los péptidos se verificaron por espectrometría de masas.

20 Los péptidos utilizados eran 30-meros que abarcaban la región extracelular de la proteína RAGE humana. La carga neta de la mayoría de los péptidos era similar.

NtermR31:	QNITARIGEPLVLKCKGAPKPPQRLEWKLN Carga neta: +7 (SEQ ID NO: 70)
Péptido 1:	KLNTGRTEAWKVLSPQGGPWDSVARVLPN Carga neta: +2 (SEQ ID NO: 71)
Péptido 2:	LPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAMNRNGKE Carga neta: 0 (SEQ ID NO: 72)
Péptido 3:	GKETKSNYRVRVYQIPGKPEIVBSASELTA Carga neta: +1 (SEQ ID NO: 73)
Péptido 4:	LTAGVPNKVGTVCVSEGSYPAGTLSWKLDGK Carga neta: +1 (SEQ ID NO: 74)
Péptido 5:	DGKPLVPNEKGVSVKEQTRRHPETGLFTLQ Carga neta: +2 (SEQ ID NO: 75)
Péptido 6:	TLQSELMVTPARGGDPRTFSCSFSPGLPR Carga neta: +1 (SEQ ID NO: 76)
Péptido 7:	LPRHRALRTAPIQPRWEPVPLEEVQLVVE Carga neta: +2 (SEQ ID NO: 77)
Péptido 8:	VVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSPQIH Carga neta: -2 (SEQ ID NO: 78)
Péptido 9:	QIHWMKDGVPLPLPPSPVLILPEIGPQDQG Carga neta: +0 (SEQ ID NO: 79)
Péptido 10:	DQGTYSVCVATHSSHGPKESRAVSISIIIEPG Carga neta: -1 (SEQ ID NO: 80)

25 Manchas consistentes en diferentes cantidades de proteína/péptido (30 ng, 10 ng, 3 ng, 1 ng, 0,3 ng, 0,1 ng, 0,03 ng, y 0,01 ng) en un volumen de 1 µL en 1 x PBS se aplicaron por puntos sobre una Membrana de Nitrocelulosa ECL Hybond (Amersham, RPN68D) por duplicado. Las membranas se secaron y la fijación inespecífica se bloqueó

por agitación de las membranas durante 1 hora a la temperatura ambiente con reactivo Western Blocking (Roche, No. 1.921.673). Se desechó el reactivo de bloqueo y las membranas se incubaron con anticuerpos en una concentración de 7,14 nM (agitación, 1 hora a temperatura ambiente). Los anticuerpos monoclonales eran ML37-7F9, ML37-11E6, y ML37-4E5, anticuerpos disponibles comercialmente de R&D Systems (v.g. AF1145). Las transferencias se lavaron 4 veces (cada vez 5 minutos de incubación con agitación a la temperatura ambiente) con 1 x PBS. Las transferencias se incubaron luego con anticuerpo secundario IgG AP anti-ratón de cabra (Sigma No. A-7434) diluido 1:2000 en reactivo Western Blocking (Roche, No. 192173). Se realizó como anteriormente la incubación durante 1 hora (agitación, temperatura ambiente). Los filtros se lavaron 4 veces (5 minutos cada vez) en 1 x PBS. El desarrollo de las señales se realizó conforme a las instrucciones de los fabricantes con solución sustrato NBT/BCIP (Roche, No. 1.697.471). El desarrollo del color se paró después de 10 minutos con agua bidestilada. Véase la Figura 2.

Aunque se detectó husRAGE en las hibridaciones puntuales en los tres anticuerpos monoclonales de la presente invención y en el anticuerpo policlonal AF1145 (procedente de una fuente comercial, R&D) ninguno de los péptidos era detectado por los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Sin embargo, el anticuerpo policlonal detectaba varios péptidos. El péptido 9, que incluía de hecho la secuencia de aminoácidos utilizada para generar anticuerpos policlonales como ha sido descrito por Ostendorp et al (EMBOJ. 26, 3875, 2007), era claramente detectado por el anticuerpo policlonal disponible comercialmente. Estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales de la presente invención reconocen claramente un epítipo diferente que los anticuerpos disponibles corrientemente.

La caracterización ulterior de la fijación se realizó por análisis de mutantes RAGE de sRAGE humano expresado en *E. coli*. Los anticuerpos monoclonales 11E6 y 4E5 se fijan a una región que se encuentra alrededor del dominio C2, dado que la fijación se pierde en los mutantes de delección que carecen de los aminoácidos 235-336, y la fijación es evidente en la proteína RAGE mutante constituida por los aminoácidos 235-336.

Ejemplo 4: Interacción entre el globulómero AB1-42 y la proteína derivada de husRAGE utilizando tecnología HTRF

El ensayo está basado en la tecnología HTRF (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo) disponible de CIS Bio International (Bagnols, Francia).

Los componentes HTRF Donante y Aceptor, Anti-6 HIS-Europiumcryptate (Catálogo CIS Bio No.: 61 HISKLA; 500 pocillos/13 µg) y estreptavidina XL-665 (Catálogo CIS Bio No.: 611 SAXLA, 500 pocillos/250 µg), se disolvieron cada uno en 250 µL de agua bidestilada. Estas soluciones stock se diluyeron 100 veces en PBS, 0,1% BSA, pH 7,4 para obtener soluciones de trabajo con concentraciones finales de 3,7 nM anti6HIS-Criptato y 60,6 nM estreptavidina XL-665. Se prepararon soluciones de 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,0625 µM, 312,5 nM, y 156,25 nM del globulómero Aβ biotinilado (1/5 del péptido Aβ 1-42 utilizado para preparar los globulómeros Aβ eran biotinil-amiloide β-proteína (1-42) (Bachem No. H-5642) de acuerdo con Barghorn et al. (J. Neurochemistry, vol. 95, no 3, pp. 834-847, 2005 y WO/2007/062852; Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/011530); la concentración de globulómero utilizada se calculó basándose en la concentración de monómeros Aβ 1-42, que se utilizaron para la generación de los globulómeros. Se prepararon soluciones de 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,312 µM, 0,156 µM, del

globulómero A β biotinilado en el mismo tampón (PBS, 0,1% BSA, pH 7,4). Se mezclaron 4 μ L de estas soluciones o 4 μ L de tampón con 4 μ L de proteína husRAGE recombinante y la solución se incubó a la temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por la adición de 4 μ L de cada una de las soluciones (3,7 nM Anti6HIS-Criptato y 60,6 nM de estreptavidina XL-665).

5 El ensayo se incubó durante 2 horas a 4°C. Después de adición de 4 μ L de una solución stock 2 M de KF, la señal de HTRF se midió en modo HTRF en un instrumento de fluorescencia BMG Pherastar (BMG Labtech GmbH, Alemania). Se utilizaron curvas de señal máximas sin anticuerpo y resultados de ruido de fondo utilizando sólo solución de Anti6HIS-Criptato o solución de Estreptavidina XL. Los valores % DeltaF se calcularon de acuerdo con las instrucciones del fabricante CisBio utilizando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Ejemplo 5: Inhibición de la fijación del globulómero A β 1-42 a husRAGE por anticuerpos utilizando tecnología HTRF

15 Se utilizó el protocolo básico que se ha descrito arriba con pocas modificaciones. Los componentes HTRF donante y aceptor se diluyeron 40 veces a 10,25 nM para Anti6HIS-Europiumcryptate y 151,5 nM para Estreptavidina XL-665 en PBS, pH 7,4, 0,1% BSA.

20 Se utilizaron anticuerpos monoclonales (MABs) purificados contra husRAGE o inmunoglobulinas de control (IgG 1 de ratón e IgG 2A de ratón; no. M-5284 o respectivamente no. M-5409; Sigma, Alemania) como anticuerpos de control.

25 El ensayo se realizó en un volumen total de 20 μ L en placas de 384 pocillos. Para cada punto de ensayo se incubaron 4 μ L de husRAGE 1 μ M con 4 μ L de anticuerpo de test o anticuerpos IgG de control en concentraciones de 2 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M, 0,125 μ M, 62,5 nM, 31,25 nM, 15,62 nM, 7,81 nM, 3,9 nM durante 1 hora a la temperatura ambiente. El control del ruido de fondo se realizó sin husRAGE y sin anticuerpos. La señal máxima se obtuvo sin anticuerpos. Subsiguientemente, se añadieron 4 μ L de globulómero A β biotinilado 800 nM, así como 2 μ L de 10,25 nM para Anti6HIS-Europiumcryptate y 151,5 nM para Estreptavidina XL-665. Las diferencias en volumen se ajustaron por adición de tampón de fijación (1 x PBS pH 7,4; 0,1% BSA). El ensayo se incubó durante 1 hora más. Después de adición de 4 μ L de una solución stock de KF 2M, la señal HTRF se midió en modo HTRF en un instrumento de fluorescencia Pherastar BMG (BMG Labtech GmbH, Alemania). Se utilizaron curvas máximas de señal sin anticuerpo y los resultados de ruido de fondo utilizando sólo solución de Anti6HIS-Criptato o solución de Estreptavidina XL. Los valores % DeltaF se calcularon de acuerdo con las instrucciones del fabricante CisBio utilizando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA). Los resultados se presentan en las Figuras 3A, 3B y 3C. Las concentraciones indicadas en las figuras son las concentraciones finales de las proteínas en un volumen de ensayo de 20 μ L.

35 Como se muestra en la Figura 4, husRAGE que expresaba los 3 dominios de RAGE se fijaba de hecho a los globulómeros A β de amiloide. Una proteína mutante de RAGE que consistía en sRAGE humano que carecía de la mayor parte del dominio-v (RAGE 102-331) se fijaba de hecho con mayor afinidad a los globulómeros A β de amiloide, indicando que el dominio dentro de RAGE humano para fijación a los globulómeros A β está dentro del término C.

Ejemplo 6: Fijación de los globulómeros A β a la proteína sRAGE utilizando la tecnología de ensayo de cribado ALFA

5 Este ensayo se realizó en tampón de ensayo (HEPES 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 y 0,1% BSA) en un volumen de 20 μ L. Las cuentas donantes utilizadas se recubrieron con estreptavidina (Perkin Elmer; 6760002S) y las cuentas aceptoras utilizadas eran de Proteína A ALPHALISA (Perkin Elmer; CUSM6413300EA), 4 μ L de cada una de las cuentas se pre-diluyeron con 196 μ L de tampón de ensayo.

10 Utilizando una Proxi-Plate de 384 pocillos (Perkin Elmer, no. 6006280), las cuentas donantes se cargaron con globulómeros A β -biotina (véase arriba) utilizando 4 μ L de las cuentas donantes prediluidas y 6 μ L de una solución 200 nM de globulómeros A β biotinilados.

15 Las cuentas aceptoras se cargaron con cantidades diferentes de proteínas de fusión RAGE-Fc utilizando 4 μ L de las cuentas aceptoras prediluidas y 6 μ L de diluciones diferentes de proteínas de fusión RAGE-Fc (comenzando v.g. con 100 μ g/mL).

La carga (fijación de las proteínas a las cuentas) se realizó en la oscuridad a la temperatura ambiente durante 30 minutos.

20 La fijación de los globulómeros A β a RAGE se inició por combinación de las preparaciones de cuentas donantes y aceptoras precargadas durante 180 minutos adicionales en la oscuridad. Las señales se midieron en un instrumento ALPHA-Quest (Perkin Elmer) con un retardo temporal de 1 segundo. Los análisis posteriores se realizaron utilizando software GraphPadPrism. En un experimento diferente pero utilizando la misma tecnología, la fijación de los globulómeros A β a RAGE-Fc constituido por los tres dominios, se comparó con la fijación de los globulómeros A β a la proteína mutante RAGE-Fc constituida por el dominio v solamente (aminoácidos 1-130 de huRAGE). Como se muestra en la Figura 5, la fijación de globulómeros A β de amiloide a los tres dominios de RAGE soluble era fuerte y la fijación de los globulómeros A β de amiloide al dominio v de RAGE era insignificante. Dado que la fijación de globulómeros A β a RAGE tiene lugar en la región C-terminal, podría predecirse que los anticuerpos que se fijaban preferiblemente a estos dominios compiten con esta fijación.

30

Ejemplo 7: Construcción, expresión y purificación de los fragmentos RAGE de E. coli

7.1. Preparación de constructos

35 Los constructos RAGE de E. coli enumerados en la Tabla 6 se generaron como sigue. El constructo 1 se creó por amplificación PCR a partir del plásmido molde pcDNA3 (-) 6.1 C HIS A utilizando el cebador directo (atgctacatatgaaaaagacagctatcgcgatt g cagtggcactggctggttccctaccgtagcgcaggccgctcaaaacatcacagcc (SEQ ID NO: 89)) y el cebador inverso (atgtactcagagtcagtggtggtgg tgggtggtgagttccagcctgatcctccacagagcctgcagttggccctcc (SEQ ID NO: 90)), que introducían sitios de restricción NdeI y XhoI que se utilizaron para subclonación en los sitios análogos de pET29. Los constructos restantes (#2-#7, Tabla 6) se generaron utilizando el Constructo 1 como molde. Las secuencias codificantes de los residuos de aminoácidos RAGE 24-129, 24-234, 24-336, 130-234, 130-336, y 235-336 se amplificaron por PCR a partir del Constructo 1. Los fragmentos de DNA resultantes se pasaron sobre un gel de agarosa al 1,0%, y el DNA se purificó utilizando el Kit de Extracción de gel QIAquick de Qiagen. Los

fragmentos de DNA se digirieron con NdeI y XhoI, y se ligaron en pET28a digerido análogamente. La mezcla de ligación se transformó en células competentes Max Efficiency DH5α y se extendió en placas de agar LB que contenían 50 mg/L de kanamicina. Después de incubación durante una noche a 37°C, tres colonias de cada clon se inocularon en 3 µl de caldo LB que contenía 50 mg/L de kanamicina y se agitaron durante una noche a 37°C. El DNA se aisló utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen, y el inserto se secuenció utilizando cebadores específicos del promotor T7 y el terminador T7. Las secuencias de DNA de los plásmidos que codificaban los constructos #1-#7 se enumera como SEQ ID Nos.: 27-33 y las regiones traducidas correspondientes se enumeran como SEQ ID Nos.: 34-40.

10

Tabla 6: Constructos RAGE

Constructo #	Nombre de la Forma de Proteína	SEQ ID de la Proteína	SEQ ID del Plásmido
1	OmpA-[RAGE (23-340)]-6His	34	27
2	6His-(Thr)-[RAGE (24-129)]	35	28
3	6His-(Thr)-[RAGE (24-234)]	36	29
4	6His-(Thr)-[RAGE (24-336)]	37	30
5	6His-(Thr)-[RAGE (130-234)]	38	31
6	6His-(Thr)-[RAGE (130-336)]	39	32
7	6His-(Thr)-[RAGE (235-336)]	40	33

La cepa BL21 (DE3) de *E. coli* se transformó con el DNA del plásmido Constructo #1, se extendió en placas LB que contenían kanamicina (50 mg/L), y se incubó a 37°C durante una noche. Al día siguiente, 14 frascos Fernbach, cada uno de los cuales contenía 1 L de Caldo Terrific con kanamicina (50 mg/L), se inocularon con una CFU y se pusieron en agitación (a 180 rpm) en una incubadora a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ nm de 0,47, los matraces se transfirieron a una incubadora a 30°C (manteniéndose todavía en agitación a 180 rpm) y se indujo la expresión por adición de IPTG 0,4 mM. Las células se cosecharon 4 horas después de la inducción por centrifugación (15900 g, 8 minutos, 4°C), y la pasta de células se congeló luego a -80°C hasta su purificación.

15

20

La purificación del Constructo 1 de RAGE prosiguió por descongelación en primer lugar seguida por resuspensión de un sedimento de células de ~ 20 g en 180 mL de tampón de lisis [Tris 50 mM de pH 7,6, NaCl 300 mM, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100, MgCl₂ 0,5 mM, imidazol 20 mM, 1 x inhibidores de proteasas exentos de EDTA Roche, 20 U/mL de DNasa I]. Las células se lisaron por paso de la suspensión 3 veces consecutivas a través de un microfluidizador Avestin Emulsiflex a 3°C. El lisado clarificado se cargó luego en una columna IMAC HiTrap de 5 ml (GE Healthcare, 17-5255-02) a 2 mL/min. La columna se lavó luego con 10 CV de tampón de lavado [Tris 50 mM de pH 7,6, NaCl 300 mM, 10% glicerol, imidazol 20 mM]. Después del paso de lavado, se eluyó RAGE en gradiente utilizando tampón de elución [Tris 50 mM de pH 7,6, NaCl 300 mM, 10% glicerol, imidazol 500 mM]. Las fracciones que contenían RAGE se agruparon y se dializaron luego contra Tris 50 mM de pH 7,6, NaCl 20 mM, 10% glicerol. El análisis por espectroscopía de masas del material purificado confirmó que el líder OmpA se había eliminado por procesamiento y que el material purificado comenzaba con el residuo 23 de RAGE (es decir, la secuencia A-Q-N...) como se esperaba.

25

30

Los plásmidos que codifican los constructos #2-#7 se transformaron por separado en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, se extendieron en placas de LB que contenían kanamicina (50 mg/L), y se incubaron a 37°C durante una noche. Al día siguiente, se inoculó 1 L de medio TB Overnight Express Instant (Novagen) con una colonia y se agitó mediante 19 horas a 30°C. Las células se redujeron a un sedimento por centrifugación (15900 x g, 10 minutos, 4°C) y se congelaron luego a -80°C. Los sedimentos (5-6 gramos cada uno) se descongelaron y se resuspendieron en 50 mL de tampón de lisis [Tris 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, 0,1% Triton X-100, 10% glicerol, 0,2 mg/mL de lisozima, 1 mL del cóctel inhibidor de proteasas Set III (Calbiochem), 20 U/mL de benzonasa, B-mercaptoetanol 5 mM]. Los lisados se trataron por ultrasonidos en un instrumento Vibra Cell Sonicator durante 2 minutos, seguido por centrifugación a 20 K x g durante 30 minutos. Columnas Econo-Pac 10 de Bio-Rad se llenaron con un volumen de lecho de 2 mL de resina ProBond Nickel y se equilibraron con tampón de lisis. Los lisados clarificados se pasaron 3 veces consecutivas a través de las columnas, seguido por lavado con 3 x 10 volúmenes de columna (60 mL en total) de tampón de lavado [2 x PBS, imidazol 20 mM, 10% glicerol, B-mercaptoetanol 5 mM]. Las proteínas se eluyeron de las columnas con 5 x 1 volúmenes de columna (10 mL en total) de tampón de elución [2 x PBS, imidazol 500 mM, 10% glicerol, B-mercaptoetanol 5 mM]. El material eluido se transfirió a PBS, 10% glicerol, y DTT 1 mM utilizando columnas Bio-Rad Econo-Pac 10 D.

7.2. Expresión de anticuerpos monoclonales anti-RAGE 11E6, 4E5 y 7F9

El medio utilizado para la expansión de las células de hibridoma consistía en BD Cell MAb Quantum Yield Medium (Becton Dickinson, Catálogo #220511) que contenía 10% de suero bovino fetal IgG ultrabajo (Invitrogen-catálogo #16250-078). Resumidamente, cultivos de siembra múltiples de 300 ml del linaje de células de hibridoma murino que expresaban el anticuerpo monoclonal de RAGE 11E6 se expandieron en un frasco rodante de 2 L que se mantenía en agitación en una incubadora (65 rpm, 8% CO₂, 37°C) hasta alcanzar una densidad de 1,0 x 10⁶ células/mL. Las células se sembraron luego en 20 L de medio a una densidad de 0,06 x 10⁶ células/mL en un BioReactor Ware de 25 L con ajustes operativos de 14 oscilaciones/minuto, un ángulo de oscilación de 6°, temperatura de 37°C, y una velocidad de borboteo de CO₂ al 8% de 0,15 Lpm. Después de 2 días, el cultivo se expandió ulteriormente por adición de medio hasta un volumen final de 24 L, dando como resultado una nueva densidad de células de 0,43 x 10⁶ células/mL. El cultivo se cosechó 12 días después de expandirse al volumen total. Las células se separaron por centrifugación continua (Carr ViaFuge, 6000 rpm, 1,7 Lpm). Después de adición de NaN₃ 5 mM (procedente de un stock de NaN₃ 1 mM (Hampton Research) al medio clarificado, utilizándose inmediatamente el material en el proceso de purificación.

El medio utilizado para la expansión de las células de hibridoma consistía en Medio BD Cell MAb Quantum Yields (Becton Dickinson-catálogo #220511 que contenía 10% de suero bovino fetal IgG ultrabajo (Invitrogen - catálogo #16350-078). Resumidamente, cultivos múltiples de siembra de 300 ml del linaje de células de hibridoma murino que expresaban el anticuerpo monoclonal de RAGE 4E5 se expandieron en un matraz rodante de sacudidas de 2L en una incubadora (65 rpm, 8% CO₂, 37°C) hasta alcanzar una densidad de 1,0x10⁶ células/ml. Las células se sembraron luego en 5L de medio a una densidad de 0,12 x 10⁶ células/ml en un BioReactor Wave de 25 L con ajustes operativos de 12 oscilaciones/minuto, un ángulo de oscilación de 6°, temperatura de 37 °C, y una velocidad de borboteo de CO₂ al 8% de 0,15 litros/minuto. Después de 4 días, el cultivo se expandió ulteriormente por adición de medio a un volumen final de 24 l, dando como resultado una nueva densidad de células de 0,24 x 10⁶ células/mililitro. La tasa de oscilación se aumentó a 14 oscilaciones/minuto. El cultivo se recogió 12 días después de la expansión al volumen total. Las células se separaron por centrifugación continua (Carr ViaFuge, 6000 rpm, 1,7

litros/minuto). Después de la adición de NaN_3 5mM (de un stock de NaN_3 1M – Hampton Research) al medio clarificado, el material se utilizó inmediatamente en el proceso de purificación.

5 El medio utilizado para la expansión de las células de hibridoma era el medio BD Cell MAb Quantum Yield (Becton Dickinson – catálogo # 229511) que contenía 10% de suero bovino fetal ultra-bajo en IgG (Invitrogen – catálogo # 16250-078). Resumidamente, cultivos múltiples de 300 ml del linaje de células de hibridoma murino que expresaban el anticuerpo monoclonal 7F9 de RAGE se expandieron en una botella de sacudidas rodante de 2 l en una incubadora (65 rpm, 8% CO_2 , 37°C) hasta alcanzar una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/ml. Las células se sembraron luego en 10L de medio a una densidad de $0,05 \times 10^6$ células/ml en un BioReactor Wave de 25 L con ajustes
 10 operativos de 12 oscilaciones/minuto, un ángulo de oscilación de 6°, temperatura de 37 °C, y una velocidad de borboteo de CO_2 al 8% de 0,15 litros/minuto. Después de 4 días, el cultivo se expandió ulteriormente por adición de medio a un volumen final de 25 L, dando como resultado una nueva densidad de células de $0,25 \times 10^6$ células/mililitro. La tasa de oscilación se aumentó a 14 oscilaciones/minuto. El cultivo se recogió 10 días después de la expansión al volumen total. Las células se separaron por centrifugación continua (Carr ViaFuge, 6000 rpm, 1,7
 15 litros/minuto). Después de la adición de NaN_3 5mM (de un stock de NaN_3 1M – Hampton Research) al medio clarificado, el material se utilizó inmediatamente en el proceso de purificación.

7.3. Purificación de los anticuerpos monoclonales anti-RAGE 11E6, 4E5, 7F9

20 Al medio de cultivo de hibridoma clarificado, se añadieron glicina y NaCl a concentraciones finales de 3 M y 1,5 M, respectivamente. El pH se ajustó a 8,0 con NaOH. El material se filtró utilizando un filtro de membrana Pall Capsule #120 de 5 μm , y se cargó en una columna BioSeptra Proteína A de 200 mL. La solución de proteína se lavó con 11 CV de tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM de pH 8,0, azida de sodio 1 mM) y se eluyó utilizando un gradiente escalonado de glicina 50 mM (pH 3,0). Se recogieron fracciones de 100 mL y la concentración de proteínas se
 25 determinó por medida de la $A_{280\text{nm}}$. Todos los pasos de procesamiento de la columna se realizaron a 4°C. El material acumulado se dializó contra 20 L de Tris 10 mM de pH 8,0, durante una noche a 4°C. Se realizó una purificación cromatográfica ulterior utilizando un cartucho de cambiador de aniones básico fuerte Sartobind Q Singlesep Mini (Sartorius) en modo de flujo continuo a 10 mL/min. El anticuerpo no se fija a la columna y se recoge como una reserva. Después de este paso, el material se concentró a 5 mg/mL utilizando una celdilla de presión agitada Amicon
 30 (membrana 5000 MWCO, 75 psi (516,75 kPa) 4°C). Finalmente, el anticuerpo se dializó dos veces contra 20 L de tampón PBS (fosfato 10 mM, NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M, pH 7,4), cada ciclo durante 24 horas a 4°C.

7.4. Experimento de fijación ELISA:

35 Los antígenos (proteínas purificadas de los constructos #1-7) se diluyeron en Tampón de Revestimiento [NaHCO_3 100 mM, pH 8,2] a 1 $\mu\text{g/mL}$, y 100 μL de la solución resultante se dividieron luego en partes alícuotas en una placa de 96 pocillos Nunc Inmuno (Maxi-Sorb Surface, de fondo plano, catálogo #439452). La placa se selló con film sellador y se incubó a 4°C durante una noche. Al día siguiente, los pocillos de las placas se lavaron cada uno tres veces con 150 μL de tampón PBST [Sigma PBS + 0,05% Tween 20]. Se añadieron luego a cada pocillo 300 μL de
 40 solución de bloqueo (3% NFDm en PBST). La placa se incubó durante 2 horas a la temperatura ambiente y se agitó a 100 rpm. Después del paso de incubación, cada pocillo se lavó de nuevo 3 veces con 150 μL de PBST. Se añadieron 100 μL del anticuerpo correspondiente a testar (es decir 7F9, 11E6 y 4E5) a diversas diluciones preparadas en PBST/0,5% BSA. La placa se selló luego con film sellador y se incubó durante 2 horas a la

temperatura ambiente y con agitación a 100 rpm. A continuación, la solución de anticuerpo se vació de los pocillos, y cada pocillo se lavó luego 3 veces con 200 μ L de PBST. Se añadió luego a cada pocillo 200 μ L de una dilución 1:5000 (en PBST/1% NFDm) de anticuerpo secundario conjugado [conjugado HRPO anti-ratón de burro, Jackson ImmunoResearch, catálogo #715-035-150]. Se cubrió la placa y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente mientras se agitaba a 100 rpm. Después de esta incubación, la solución se retiró de los pocillos y cada pocillo se lavó 3 veces con 200 μ L de PBST. Se añadieron a cada pocillo 100 μ L de solución sustrato HRPO [Sustrato Líquido de 3,3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB), supersensible para ELISA, Catálogo Sigma #T4444], y la placa se incubó a la temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, se añadieron 50 μ L de H₂SO₄ 2 M a cada pocillo para parar la reacción y se midió la A_{540nm} de cada pocillo utilizando un lector de placas de microtitulación.

Los resultados de estos experimentos de fijación se muestran en las Figuras 6A, 6B y 6C, y en las figuras 7A, 7B y 7C. Las Figuras 6A, 6B y 6C demuestran que los residuos RAGE 24-234 no estaban implicados en la fijación de los anticuerpos monoclonales de RAGE 11E6, 4E5, o 7F9. Inversamente, como se muestra en las Figuras 7A, 7B y 7C, los residuos de RAGE 235-336 eran suficientes para la fijación de los anticuerpos monoclonales RAGE 11E6 y 4E5. El mAb de RAGE 7F9 no exhibía fijación alguna a ninguno de estos fragmentos RAGE (expresados en *E. coli*).

Ejemplo 8: Mapeado de epítomos

8.1. Inmovilización de los anticuerpos 11E6, 4E5 y 7F9

Aproximadamente 20 mg de resina Sepharose de flujo rápido activada con CNBr se pesaron en tres columnas de reacción compactas provistas de fritas de 35 μ m. Se dejó que las resinas se hincharan en 200 μ L de HCl 1 mM antes de lavarlas tres veces con 200 μ L de HCl 1 mM. Las resinas se lavaron subsiguientemente tres veces con 200 μ L de tampón de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,3) que contenía cloruro de sodio 500 mM (tampón A). Una vez completadas, las soluciones se lavaron de las columnas de tal modo que quedaba únicamente una capa delgada de tampón en la superficie de cada resina. Aproximadamente 5,5 nanomoles de los anticuerpos estaban inmovilizados en las resinas, lo que requirió la adición de 235 μ L de 7F9 (3,4 mg/mL), 500 μ L de 11E6 (1,6 mg/mL), y 200 μ L de 4E5 (3,75 mg/mL). Para las inmovilizaciones de los anticuerpos 7F9 y 4E5, se incluyeron también 200 μ L de tampón A. Las columnas de reacción compactas se sellaron y se dejó que se mezclaran por inversión a la temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez completado esto, las columnas de reacción compactas se abrieron y se lavaron con tres adiciones de 200 μ L de tampón A para eliminar el anticuerpo no fijado. Después del lavado, se añadieron a cada columna 200 μ L de un tampón que contenía Tris-HCl 100 mM (pH 8) y cloruro de sodio 500 mM (tampón B). Las columnas se sellaron de nuevo y se dejaron mezclar por inversión a la temperatura ambiente para bloquear los sitios no fijados pero activados en las resinas. Después de 2 horas, se abrieron las columnas y se lavaron en primer lugar con 200 μ L de tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 4) que contenía cloruro de sodio 500 mM (tampón C), seguido por 200 μ L de tampón B. Este proceso se repitió dos veces más para asegurar la eliminación completa del anticuerpo no fijado y para bloquear por completo los sitios restantes de fijación en las resinas. Las resinas se lavaron luego 4 veces con 200 μ L de tampón de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,3) que contenía cloruro de sodio 100 mM (tampón D), antes del acoplamiento del antígeno.

8.2. Escisión proteolítica de los antígenos sRAGE expresados en *E. coli* y BacMam

Se dejó que los antígenos sRAGE se fijaran a las columnas de anticuerpos por adición de 75 μ L del antígeno expresado en *E. coli* a las resinas 11E6 y 4E5 y adición de 125 μ L del antígeno expresado en *BacMam* a las resinas de 11E6, 4E5 y 7E9. Las columnas se sellaron y se dejó que las muestras se mezclaran por inversión a la temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado este tiempo, se abrieron las columnas y se lavaron con cuatro adiciones de 200 μ L de tampón D. Después de vertido concienzudo de los lavados, las resinas se resuspendieron en 200 μ L de tampón D así como con las proteasas, generadas como soluciones de 0,1 mg/mL de tripsina, endoproteinasa Glu-C o quimotripsina. Las cantidades de las proteasas variaban entre los experimentos para atenuar las digestiones, pero abarcaban desde 200 a 400 veces de exceso del antígeno con respecto a la proteasa en peso. Se dejó que tuviera lugar la proteólisis a la temperatura ambiente con mezcladura por inversión durante 12 horas. Después de este tiempo, se abrieron las columnas y la solución proteolítica se lavó y se recogió para análisis ulterior. Para las muestras sometidas a digestión dual, las resinas se resuspendieron en 200 μ L de tampón D y una segunda proteasa antes del paso siguiente. Para aquellas muestras no tratadas con una segunda proteasa, las columnas se sometieron a lavados individuales de 200 μ L en tampón D seguido por un lavado de 200 μ L en tampón A y finalmente un lavado de 200 μ L en tampón D. Cada lavado se retuvo por separado para análisis ulterior. Los péptidos que contenían el epítipo se eluyeron de la columna con 3 lavados individuales de 200 μ L en ácido fórmico al 2%. Cada muestra de elución se retuvo por separado para análisis ulterior.

8.3. Análisis por espectrometría de masas de los péptidos que contenían epítipo

Las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de masas Bruker Apex QE7T de Resonancia Ion-Ciclotrón con Transformada de Fourier (FT-ICR) y un espectrómetro de masas Q-STAR Pulsar I de Applied Biosystems. Para el análisis espectrométrico de masas FT- ICR, se inyectaron 8 μ L de las muestras de escisión del epítipo en una columna de fase inversa Jupiter C4 (0,5 x 150 mm, tamaño de partícula 5 μ m, tamaño de poro 300 Å) con un HPLC capilar Agilent Serie 1100. Las muestras se lavaron durante 5 minutos en 90% de agua con 0,1% de ácido fórmico (disolvente A)/10% acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico (disolvente B) a un caudal de 5 μ L/min para desalado. Los péptidos se eluyeron en el espectrómetro de masas por cambio de la composición de la fase móvil a 5% disolvente A/95% disolvente B. Las muestras que requerían infusión directa para espectrometría de masas en tándem se inyectaron en un Microtrap de proteínas (Michrom) equilibrado en 98% de agua, 1% acetonitrilo y 1% ácido fórmico. Las muestras se lavaron con 1 mL de disolvente de equilibración antes de ser eluidas en 300 μ L de 60% acetonitrilo/40% agua y 0,1% ácido fórmico. El eluyente se infundió directamente en el espectrómetro de masas FT-ICR a 2 μ L/min. Para el espectrómetro de masas Pulsar Q-Star, se inyectaron entre 5 y 30 μ L de la muestra en un Microtrap de proteínas (Michrom) por medio de un HPLC Agilent Serie 1100. Las muestras se lavaron en 95% disolvente A/5% disolvente B durante 1 minuto antes de elución de los péptidos fijados en el espectrómetro de masas en 5% disolvente A/95% disolvente B.

La escisión proteolítica del sRAGE expresado en *E. coli* fijado al anticuerpo 11E6 y elución de los péptidos que contenían el epítipo reveló la presencia de un péptido con una masa de 12204,5 Da. La selección de masas y disociación activada por colisión del estado de carga 10^+ confirmaron la identidad de este péptido, que correspondía a los residuos Val²²⁹-His³⁴⁶ (este residuos His es debido a la adición de la etiqueta Hexa-His a la proteína sRAGE). El mapeado ulterior del epítipo utilizando proteólisis con tripsina seguida por quimotripsina revelaba la escisión de la etiqueta hexahistidina C-terminal, refinando así el epítipo a los residuos Val²²⁹-His³⁴¹ (este residuo His es debido a la adición de la etiqueta Hexa-His a la proteína sRAGE). No pudo obtenerse refino ulterior alguno de este epítipo utilizando proteólisis. La escisión proteolítica ejecutada análogamente del sRAGE expresado en *E. coli* fijado al

anticuerpo 4E5 reveló el mismo péptido de 12204,5 Da que se observaba para el epítipo del anticuerpo 11E6. Correspondientemente, la escisión del sRAGE expresado en BacMam fijado al anticuerpo 11E6 o 4E5 revelaba dos péptidos que contenían el epítipo de masas principal 10671,9 Da y 10614,0 Da. Estos péptidos coinciden con el terminal C del constructo expresado por BacMam, abarcando los residuos Val²²⁹-Gly³³¹ y Val²²⁹-Ala³³⁰,
5 respectivamente.

La escisión proteolítica del sRAGE expresado en BacMam fijado al anticuerpo 7F9 y elución de los péptidos que contenían el epítipo reveló especies múltiples que representaron varios péptidos solapantes. La deconvolución del espectro de masas reveló péptidos de masas 12,079.6 Da, 12,372.9 Da, 13,477.3 Da y 24,132.3 Da. Estas masas coinciden con los residuos Asn¹⁰⁵-Arg²¹⁶, Asn¹⁰⁵-Arg²¹⁸, Asn¹⁰⁵-Arg²²⁸ y Asn¹⁰⁵-Gly³³¹, respectivamente, sugiriendo un epítipo mínimo que abarca los residuos Asn¹⁰⁵-Arg²¹⁶.
10

Estos resultados indican que los anticuerpos 11E6 y 4E5 poseen epítopos en los términos C de sRAGE expresado tanto en *E. coli* como en BacMam, y que el anticuerpo 7F9 reconoce un epítipo en el dominio central de sRAGE expresado en BacMam.
15

Ejemplo 9: Medidas por Biacore y resonancia de plasmones de superficie.

La afinidad de los tres anticuerpos monoclonales de la presente invención, es decir 7F9, 11E6 y 4E5, se midió utilizando medidas Biacore y de resonancia de plasmones de superficie.
20

9.1. Materiales y métodos para determinaciones de la cinética de fijación anti-RAGE

Se utilizó un instrumento Biacore 2000 para medir la cinética de fijación de mAb anti-RAGE de ratón. El formato de ensayo para el análisis de afinidad de mAb era la captura basada en Fc por los anticuerpos anti-Fc inmovilizados. Se empleó un protocolo estándar de acoplamiento de aminas para inmovilizar IgG específica de Fc por aminas primarias a la superficie de carboxi-metil (CM)-dextrano de chips sensores CM5 (Biacore). Para el estudio de los mAbs anti-RAGE de ratón, se utilizó Fc anti-ratón (Biacore, anti-ratón, BR-1005-14) como el reactivo de captura inmovilizado. Se utilizó un protocolo automático, disponible en el Biacore 2000, para inmovilizar 8000-10000 RU de reactivo de captura en la totalidad de las cuatro celdillas de flujo del chip sensor. Resumidamente, las superficies de CM-dextrano se activaron por medio de N-hidroxisuccinimida (NHS) 50 mM: 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida (EDC) 1:1 recién preparada. A continuación, se aplicó el reactivo de captura de IgG anti-Fc (200 µg/mL en acetato de sodio 10 mM, pH 4,5) a la superficie, seguido por desactivación de la superficie y bloqueo de los sitios reactivos residuales con etanolamina 1 M (pH 8,5).
30

El tampón de ejecución empleado era HBS-EP+ [HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% surfactante P20 (Biacore)] para los mAbs anti-RAGE de ratón. Cada ciclo experimental consistía en los pasos siguientes: 1) se capturaron mAbs anti-RAGE en las celdillas de flujo 2, 3 ó 4 hasta un nivel de 50-200 R (dependiendo del antígeno). Todas las medidas se referenciaron contra la celdilla de flujo 1 que no tenía mAb anti-RAGE capturado alguno. 2) Se inyectó antígeno a la totalidad de las cuatro celdillas de flujo, 180 µL a 60 µL/min. Después de la inyección de antígeno, la disociación se monitorizó durante 600 segundos a 60 µL/min. 3) La superficie de captura anti-Fc se regeneró con glicina a pH bajo. Para las determinaciones cinéticas, las inyecciones
40

de RAGE eran una serie de diluciones al doble desde 20 nM-0,31 nM y tampón únicamente en duplicados aleatorizados.

9.2. Evaluación y resultados

5 Los datos se procesaron utilizando software de evaluación Biacore. Resumidamente, los datos se referenciaron doblemente sustrayendo en primer lugar la señal de la celdilla de referencia y en segundo lugar por sustracción de la señal de las inyecciones de tampón solo. Los datos doblemente referenciados de la serie de inyecciones de RAGE se ajustaron luego globalmente a un modelo de fijación 1:1 (Langmuir), que incluía un término de transferencia de masa, para determinar las constantes cinéticas de velocidad de fijación, k_a y k_d , y la afinidad, K_D .

La Tabla 7 muestra que 4E5 no se fijaba a RAGE de ratón (Mu-RAGE). 11E6 y 4B5 exhibían competición cruzada uno con otro para fijación a RAGE. 7F9 no se fija a RAGE producido en E. coli que carece de glicosilación.

15 La Tabla 7 muestra también los epítomos específicos a los cuales los tres anticuerpos como se describe en esta memoria se fijaban a RAGE humano, por mapeado de epítomos utilizando protección de sRAGE humano respecto a la digestión proteolítica e identificación de los péptidos protegidos con espectrometría de masas. MAb 7F9 se fijaba a C1 (Asn¹⁰⁵- Pro²¹⁵); mAb 4E5 se fijaba a C2 (Val²²⁹ - Thr³⁴⁰ en E.coli RAGE; Val²²⁹ - Gly³³¹ en husRAGE producido en células de mamífero), y 11E6 se fijaba a C2 (Val²³⁸ - Arg³¹⁴ en E.coli RAGE; Val²²⁹ - Gly³³¹ en husRAGE producido en células de mamífero).

Tabla 7: Epítomos a los que se fijan los anticuerpos

<u>Mab</u>	<u>Afinidad (nM)</u>	<u>Epítomo</u>	<u>RAGE de ratón</u>
7F9	0,11	C1; sensible a la glicosilación	+
11E6	0,29	C2; se solapa con 4E5	+
4E5	2,2	C2; se solapa con 11 E6	-

25 **Ejemplo 10: Estudios de volumen de sangre cerebral (CBV) en vivo en ratones C57BL/6 hembra**

10.1. Animales

30 Ratones C57BL/6 hembra (de 4-6 meses de edad; Taconic, Germantown, Nueva York, USA) se mantuvieron en camas estándar de chips estériles de madera en un ambiente tranquilo en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (encendido de las luces a las 06:00), con comida y agua disponibles *ad libitum*. Se utilizaron un total de 33 ratones en estudios fMRI-CBV. Todos los estudios fueron aprobados y monitorizados estrechamente por el Comité Institucional Abbott de Cuidado y Uso de Animales, con adhesión a las directrices de los Institutos Nacionales de Guía Sanitaria para cuidado y uso de animales de laboratorio en instalaciones acreditadas por la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio.

10.2. Preparación del péptido Aβ soluble

Se sintetizó Aβ 1-40 (pureza > 99%) en Abbott Laboratories. Resumidamente, se indujeron BL21 (DE3) de E. coli con IPTG 1 mM y se expresaron durante 3 horas a 41°C en una cuba de fermentación de 18 L. Se cosecharon 185
 5 gramos de pasta de células. El péptido se expresó como cuerpos de inclusión. Las células se lisaron en tampón Tris 0,1 M que contenía 0,1% de Triton X-100. El sedimento se lavó luego tres veces con tampón Tris 50 mM y una sola vez con agua. Los lavados se desecharon y el sedimento final se resuspendió en agua y se liofilizó. El sedimento liofilizado se extrajo en 500 mL de DMSO y se diluyó a 1 L con amoníaco al 0,2% en agua. Esta muestra de 1 L se dializó contra 19 L de etanol al 10% que contenía 0,1% de amoníaco. La diálisis se continuó con exactamente 0,1%
 10 de amoníaco en agua durante un tiempo total de 5 horas a la temperatura ambiente. La muestra de 1,4 L se diluyó con 0,1% de amoníaco hasta 2 L y se aplicó a una columna HPLC de 2,5 x 25 cm PLRP-S, (Polymer Labs, Amherst, MA), equilibrada con 0,1% de amoníaco en agua. La elución se realizó con acetonitrilo que contenía 0,1% de amoníaco. Se eluyó Aβ 1-40 con un gradiente desde 10 a 30% B a lo largo de 200 minutos. El material acumulado se liofilizó. Se utilizó análisis MALDI para confirmar la identidad y pureza del material. El material se purificó como Aβ
 15 Met-1-40, marcado con N15. Estaba presente una pequeña cantidad de sulfóxido de metionina a +16 unidades másicas en la muestra. Se purificaron 138 mg en esta ejecución simple como la sal de amonio del péptido. La secuencia inversa, Aβ 40-1 (pureza > 99%), se adquirió de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Los péptidos Aβ (0,01 ó 0,1 mg) se disolvieron por separado en solución salina fresca tamponada con fosfato (0,1 mL; PBS) inmediatamente antes de cada experimento fMRI-CBV. Para los estudios iniciales, se asignaron aleatoriamente los
 20 ratones a 5 grupos de tratamiento: control de PBS, Aβ 1-40 (0,01 ó 0,1 mg/ratón) o Aβ 40-1 (0,01 ó 0,1 mg/ratón), con 5 animales en cada grupo.

10.3. Preparación de los anticuerpos

25 Un anticuerpo de control negativo IgG y el anticuerpo anti-RAGE, 11E6 (ambos de pureza > 99%) se sintetizaron en Abbott Laboratories.

10.4. Medida de CBV utilizando fMRI

30 Todos los experimentos de fMRI se realizaron en un imán horizontal 7.0 T/21 cm con un inserto de gradiente de campo magnético 20 G/cm (Biospec Bruker, Billerica, MA). Los animales se anestesiaron primeramente con medetomidina (1 mg/kg, intraperitoneal; Pfizer Animal Health Exton, Pensilvania, USA) + ketamina (75 mg/kg, intraperitoneal; Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA) y se pusieron luego en una jaula de doble bobina para animales pequeños (Insight Neuroimaging Systems, LLC, Worcester, MA), que contiene una bobina volumétrica para
 35 transmisión y una bobina de superficie para recepción. Las velocidades de respiración y las formas de onda se monitorizaron continuamente mediante un transductor de fuerza. La temperatura rectal se monitorizó y se mantuvo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por medio de una compresa de agua circulante regulada por retroalimentación. Todas las imágenes se obtuvieron durante la fase de luz. La interacción electromagnética de bobina a bobina estaba desacoplada activamente. Las imágenes anatómicas se adquirieron utilizando la secuencia de pulsos espín-eco de adquisición
 40 rápida con relajación mejorada (RARE) con TR = 3s, TE eficaz = 100 ms, matriz = 256 x 256, FOV = 2,56 x 2,56 cm, 9 cortes de 1,0 mm, y 4 valores medios. Se utilizó imagen eco-planar con eco de gradiente de un solo disparo (EPI) para la adquisición de imágenes fMRI-CBV con TR = 2s, TE = 13 ms, matriz = 64 x 64, FOV = 2,56 x 2,56 cm, y que daba una resolución en el plano = 400 μm x 400 μm. Se administraron por vía intravenosa 10 mg de agente de

5 contraste FE/kg de óxido de hierro superparamagnético ultrapequeño (USPIO) (SH U555C, Schering AG, Alemania) durante 2 min en una adquisición de imágenes de 18 min. Se administraron Aβ y PBS solubles a través de la vena de la cola 6 min después del agente de contraste utilizando una bomba de jeringuilla (0,1 mL/min durante 1 min) y los cambios en CBV se detectaron luego a lo largo de un periodo subsiguiente de 10 min. El anticuerpo de control IgG 1 ó 11E6 se administró por vía intraperitoneal a los ratones en sus propias jaulas de alojamiento, 3 horas antes del comienzo de los estudios de imagen.

10.5. Análisis de los datos fMRI

10 El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete de software Análisis de Neuroimágenes Funcionales (AFNI) (Cox RW, Comput Biomed Res 29:162-173, 1996). Para identificar el cambio relativo en CBV dependiente del tiempo, se calculó rCBV (t), a partir de los datos brutos en el transcurso del tiempo basados en la relación (Mandeville et al., 1999),

15
$$rCBV(t) = \ln[s(t)/s_0(t)] / \ln[s_0(t)/s_{pre}] \quad \text{Eq.1}$$

donde s(t) es la intensidad de la señal después de infusión de Aβ o PBS, So(t) es la señal de la línea base antes de la infusión de Aβ o PBS, y S_{pre} es la intensidad media de señal antes de la administración del agente de contraste. Los cambios en rCBV en el transcurso del tiempo se liberaron de la tendencia con una función lineal para dar cuenta de la eliminación del agente de contraste de la sangre (Cox, 1996).

20

Subsiguientemente, la señal de rCBV para cada vóxel en cada ratón se ajustó a un modelo exponencial diferencial no lineal (Eq. 2) que reflejaba la cinética del fármaco (Luo et al., 2004) donde t₀ es el retardo temporal de la respuesta, k es el coeficiente multiplicador, α₁ es la velocidad de eliminación y α₂ la velocidad de absorción.

25
$$y(t) = k(e^{-\alpha_1(t-t_0)} - e^{-\alpha_2(t-t_0)}) \quad t \geq t_0, \quad \text{Eq. 2.}$$

Los valores iniciales ajustados a los parámetros t₀, k, α₁ y α₂ eran 0-45 segundos, -500-500, 0-0,15, y 0,15 -0,5, respectivamente, basados en la cinética de Aβ conocida (Shiiki et al., J Eurosci 24:9632-9637, 2004). Los vóxels finales para t₀, k, α₁ y α₂ se determinaron automáticamente utilizando AFNI basado en la significación máxima del ajuste del modelo. Los vóxels de rCBV activados se determinaron luego para p < 0,05 después de la corrección de Bonferroni.

30

Los resultados presentados en la Figura 8 indican que Aβ₁₋₄₀ disminuía el CBV de una manera dependiente de la dosis y específica de la región (con 0,01 mg Fig. 8a y con 0,1 mg Fig. 8b). La extensión de la disminución de CBV era significativamente mayor cuando los ratones se trataron con la dosis alta Fig. 8b) comparada con la dosis menor (Fig. 8a) de Aβ₁₋₄₀, aunque regiones similares del cerebro (v.g. cortex frontal, núcleo caudado, tálamo, hipocampo) se veían afectadas. En contraste con los efectos dependientes de la dosis de Aβ₁₋₄₀, el péptido inverso, Aβ₄₀₋₁, no afectaba significativamente al CBV cuando se testó a las mismas dosis (con 0,01 mg Fig. 8c y con 0,1 mg Fig. 8d) y la magnitud de cualquier disminución en CBV observada no difería significativamente del grupo de control tratado con PBS (PBS, Fig. 8e). Durante un transcurso temporal de 12 minutos, la amplitud de las disminuciones en CBV inducidas por Aβ₁₋₄₀, que abarcaban desde 10-20% para los vóxels afectados a través de varias regiones cerebrales,

35

40

alcanzaba consistentemente un máximo dentro de 5 min después de la administración, se mantenía disminuida durante la duración del estudio (datos representativos mostrados para el hipocampo en Fig. 8f) y era similar para ambas dosis de A β ₁₋₄₀. Estos datos son consistentes con un estudio adicional que utilizó la técnica de medida de flujo láser invasiva Doppler (no representado).

5 Para testar los efectos de 11E6 sobre CBV utilizando fMRI, se evaluaron primeramente los efectos de la pre-administración de un anticuerpo IgG 1 de control. Como se anticipaba, la pre-administración de un anticuerpo IgG 1 3 horas antes del comienzo de la obtención de la imagen, no bloqueaba el efecto de un enfrentamiento con A β ₁₋₄₀ (con 1,01 mg Fig. 9a). En contraste, 11E6 a una dosis de 0,1 mg/ratón dada 3 horas antes del comienzo de la obtención de imagen, bloqueaba por completo la disminución en CBV provocada normalmente por enfrentamiento con A β ₁₋₄₀ (con 0,1 mg Fig. 9b). Análogamente, las disminuciones en la amplitud de CBV se anulaban también por pretratamiento con el anticuerpo anti-RAGE, 11E6, pero no por el anticuerpo de control (Fig. 9c). Estos datos demuestran la actividad funcional *in vivo* del anticuerpo 11E6 en un modelo animal relevante para la enfermedad de Alzheimer.

15 **EJEMPLO 11: Construcción de anticuerpos injertados en CDR**

Aplicando métodos estándar bien conocidos en la técnica, las secuencias CDR de las cadenas VH y VL del anticuerpo monoclonal 11E6 (véase la Tabla 4 anterior) se injertan en diferentes secuencias aceptoras de cadenas pesada y ligera humanas diferentes. Basándose en la secuencia de las alineaciones VH y VL con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal 11E6 de la presente invención, se seleccionan las secuencias humanas conocidas siguientes:

25 a) VH7-4.1 y VH1-2 así como las secuencias de unión hJH6 para construcción de secuencias aceptoras de cadena pesada (de acuerdo con la Tabla 2 anterior);

b) 1-12/L5 y 3-15/L2 así como hJK2 para construcción de secuencias aceptoras de cadena ligera (de acuerdo con la Tabla 3 anterior).

30 Injertando las CDRs de VH y VL correspondientes de 11E6 en dichas secuencias aceptoras, se prepararon las secuencias VH y VL injertadas en CDR, humanizadas, y modificadas (véase también la Tabla 5, anterior): VH 11E6.1-GL, VH 11E6.2-GL, VL 11E6.1-GL y VL 11E6.2-GL.

35 **EJEMPLO 12: Construcción de retromutaciones de marco en anticuerpos injertados en CDR**

Para generar mutaciones marco de anticuerpos humanizados, se introducen mutaciones en los anticuerpos injertados en CDR utilizando síntesis *de novo* de dominios variables y/o cebadores mutágenos y PCR, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Se construyen diferentes combinaciones de retromutaciones y otras mutaciones para cada uno de los injertos en CDR como sigue.

40 Para la cadena pesada VH 11E6.1-GL, uno o más de los residuos de interfaz Vernier y VH/VL siguientes se someten a retromutación como sigue: V2→I, y/o Y95→F.

Para la cadena pesada VH 11E6.2-GL, uno o más de los residuos de interfaz Vernier y VH/VL siguientes se someten a retromutación como sigue: V2→I, V68→F, M70→F, R72→L, Y95→F.

5 Para la cadena ligera VL 11E6.1-GL, uno o más de los residuos de interfaz Vernier y VH/VL siguientes se someten a retromutación como sigue: A43→S, Y49→F, Y87→F.

Para la cadena ligera VL 11E6.2-GL, uno o más de los residuos de interfaz Vernier y VH/VL siguientes se someten a retromutación como sigue: A43→S, Y49→F, 158→V, Y87→F.

10 Mutaciones adicionales incluyen las siguientes:

Para la cadena pesada

VH 11E6.1-GL, Q1→E, y para

VH 11E6.2-GL, Q1→E, I76→T, R85→S, D89→E;

Para la cadena ligera

15 VL 11E6.1-GL, V11→L, y

VL 11E6.2-GL, V13→L, E70→D.

EJEMPLO 13: Construcción y expresión de anticuerpos anti-RAGE recombinantes humanizados

20 Vectores de expresión pHybE que alojaban cadenas pesadas y ligeras que contenían retromutaciones en marco se co-transfectaron en células 293-6E para producir transitoriamente anticuerpos humanizados de longitud total. Se introdujeron mutaciones en las secuencias de anticuerpos injertadas en CDR conforme al Ejemplo 11, por síntesis *de novo* del dominio variable y/o utilizando cebadores mutágenos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica.

25 Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos humanizados se exponen en la Tabla 8.

Tabla 8: Expresión de anticuerpos humanizados

SEQ ID No.	Región proteínica	Secuencia
		123456789012345678901234567890
62	VH h11E6.1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGY INTNTGESIY SEEFKGR FRVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTTVTVSS
63	VL h11E6.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCK ASQNVG TAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASNRYT GVPS RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC QQ YSSYPLTF QGQTKLEIKR
62	VH h11E6.2	

ES 2 577 718 T3

SEQ ID No.	Región proteínica	Secuencia
		EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVFVSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTITVTVSS
64	VL h11E6.2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCK ASQNVG TAVAWYQQKPGKSPKLLIF SASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYFC QQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
62	VH h11E6.3	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVFVSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTITVTVSS
65	VL h11E6.3	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC KASQNVG TAVAWYQQKPGQAPRLLIY SASNRYTGIPA RFGSGSGTDFTLTITSSLQSEDFAVYYC QQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
62	VH h11E6.4	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVFVSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTITVTVSS
66	VL h11E6.4	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC KASQNVG TAVAWYQQKPGQSPRLLIF SASNRYTGVPA RFGSGSGTDFTLTITSSLQSEDFAVYFC QQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
67	VH h11E6.5	EIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVFVSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTITVTVSS
63	VL h11E6.5	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCK ASQNVG TAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC QQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR

ES 2 577 718 T3

SEQ ID No.	Región proteínica	Secuencia
67	VH h11E6.6	<p>EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYFCARSRMVTAYGMDYWGQGTTVTVSS</p>
64	VL h11E6.6	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKSPKLLIFSASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR</p>
67	VH h11E6.7	<p>EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYFCARSRMVTAYGMDYWGQGTTVTVSS</p>
65	VL h11E6.7	<p>EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQNVG TAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYTGIPPA RFGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR</p>
67	VH h11E6.8	<p>EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYFCARSRMVTAYGMDYWGQGTTVTVSS</p>
66	VL h11E6.8	<p>EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQNVG TAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGVPA RFGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR</p>
68	VH h11E6.9	<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRVITMTRDTSSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSRMVTAYGMDYWGQGTSVTVSS</p>
63	VL h11E6.9	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR</p>

ES 2 577 718 T3

SEQ ID No.	Región proteínica	Secuencia
68	VH h11E6.10	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR VMTMTRDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
64	VL h11E6.10	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCK ASQNVG TAVA WYQQKPGKSPKLLIF SASNRYT GVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
68	VH h11E6.11	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR VMTMTRDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
65	VL h11E6.11	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC ASQNVG TAVA WYQQKPGQAPRLLIY SASNRYT GIPA RFGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
68	VH h11E6.12	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR VMTMTRDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
66	VL h11E6.12	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC ASQNVG TAVA WYQQKPGQSPRLLIF SASNRYT GVPA RFGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYFC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
69	VH h11E6.13	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR FTFTLDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
63	VL h11E6.13	

ES 2 577 718 T3

SEQ ID No.	Región proteínica	Secuencia
		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
69	VH h11E6.14	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARSRMVTAYGMDYWGQTSVTVSS
64	VL h11E6.14	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKSPKLLIFASASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
69	VH h11E6.15	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARSRMVTAYGMDYWGQTSVTVSS
65	VL h11E6.15	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQNVG TAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYTGIPA RFGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
69	VH h11E6.16	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFTFTLDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARSRMVTAYGMDYWGQTSVTVSS
66	VL h11E6.16	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQNVG TAVAWYQQKPGQSPRLLIFASASNRYTGVPA RFGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYFCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR

Específicamente, para las cadenas pesadas:

VH h11E6.1, VH h11E6.2, VH h11E6.3, y VH h11E6.4 contienen VH 11E6.1-GL, con una mutación Q1→E.

VH h11E6.5, VH h11E6.6, VH h11E6.7 y VH h11E6.8 contienen VH 11E6.1-GL, con una mutación Q1→E y las retromutaciones Vernier y VH/VL en los residuos de interfaz: V2→I y Y95→F.

VH h11E6.9, VH h11E6.10, VH h11E6.11, y VH h11E6.12 contienen VH 11E6.2-GL, con una mutación Q1→E, I76→T, R85→S, y D89→E.

5 VH h11E6.13, VH h11E6.14, VH h11E6.15, y VH h11E6.16 contienen VH 11E6.2-GL, con una mutación Q1→E, I76→T, R85→S, D89→E y las siguientes retromutaciones en los residuos de interfaz Vernier y VH/VL: V2→I, V68→F, M70→F, R72→L, y Y95→F.

Para las cadenas ligeras:

10 VL h11E6.1, VL h11E6.5, VL h11E6.9, y VL h11E6.13 contienen VL 11E6.1-GL con una mutación V11→L.0
VL h11E6.2, VL h11E6.6, VL h11E6.10, y VL h11E6.14 contienen VL 11E6.1-GL con una mutación V11→L y las retromutaciones siguientes en los residuos de interfaz Vernier y VH/VL: A43→S, Y49→F, y Y87→F.

VL h11E6.3, VL h11E6.7, VL h11E6.11, y VL h11E6.15 contienen VL 11E6.2-GL con mutaciones V13→L y E70→D

15 VL h11E6.4, VL h11E6.8, VL h11E6.12, y VL h11E6.16 contienen VL 11E6.2-GL con mutaciones V13→L y E70→D y las siguientes retromutaciones en los residuos de interfaz Vernier y VH/VL: A43→S, Y49→F, I58→V, y V87→F.

EJEMPLO 14: Caracterización de los anticuerpos humanizados 11E6 utilizando ELISA de competición

20 Placas ELISA (Costar 3369) se recubrieron durante una noche a 4°C con 50 µL/pocillo de 2 µg/mL de hRAGE (1-331) en tampón carbonato-bicarbonato de sodio 0,2 M, pH 9,4, lavado con Tampón de lavado (PBS que contenía 0,1% de Tween 20), y se bloquearon durante 1 hora a la temperatura ambiente con 200 µL/pocillo de leche en polvo desnatada al 2% en PBS. Después de lavar con Tampón de Lavado se añadió por duplicado una mezcla de un
25 m11E6 biotinilado (concentración final 0,3 µg/mL) y anticuerpo de test competidor sin marcar que comenzó a 81 µg/mL de concentración final y diluyendo serialmente 3 veces) en 50 µL/pocillo de tampón ELISA. Después de incubación de las placas durante 1 hora a la temperatura ambiente, y lavado con Tampón de Lavado, los anticuerpos fijados se detectaron utilizando 100 µL/pocillo de dilución 1:10.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Fitzgerald) en tampón ELISA. Después de incubación durante 1 hora a la temperatura ambiente, y lavado con
30 Tampón de Lavado, se realizó el desarrollo del color por adición de 100 µL/pocillo de tampón TMB (Zymed). Después de incubación durante 15 min a la temperatura ambiente, se paró el desarrollo del color por adición de 50 µL/pocillo de ácido clorhídrico 1 N. La absorbancia se leyó a 490 nm. La Tabla 9 muestra los valores CI₅₀ de anticuerpos 11E6 humanizados obtenidos utilizando el software de computadora Graphpad Prism (Graphpad Software Inc., San Diego, CA).

35

Tabla 9: Valores CI₅₀ de anticuerpos 11E6 humanizados en un ELISA competitivo

Anticuerpo	IC50 (nM)	Anticuerpo	IC50 (nM)
h11E6.1	19.7	h11E6.9	17.9
h11E6.2	N/A	h11E6.10	N/A
h11E6.3	18.8	h11E6.11	19.9

Anticuerpo	IC50 (nM)	Anticuerpo	IC50 (nM)
h11E6.4	14.1	h11E6.12	11.3
h11E6.5	16.1	h11E6.13	16.8
h11E6.6	N/A	h11E6.14	N/A
h11E6.7	15.5	h11E6.15	14.0
h11E6.8	10.8	h11E6.16	9.2

Ejemplo 15: Determinación de las constantes de fijación para la interacción de mAb antiRAGE con RAGE

5 Se utilizaron instrumentos Biacore 2000 y Biacore T100 para medir las cinéticas de fijación de mAb anti-RAGE. El formato de ensayo para el análisis de afinidad de mAb era la captura basada en Fc por anticuerpos anti-Fc inmovilizados. Se empleó un protocolo estándar de acoplamiento de amina para inmovilizar IgG específica de Fc por aminas primarias a la superficie de carboxi-metil (CM-dextrano de chips y sensores CM5 (Biacore). Para el estudio de los mAbs anti-RAGE de ratón, se utilizó Fc anti-ratón (Biacore, BR-1005-14 anti-ratón) como el reactivo de captura inmovilizado y para el estudio de mAbs anti-RAGE humanizados, se utilizó Fc anti-humano (Pierce 31125) como reactivo de captura inmovilizado. Un protocolo automático, disponible en los equipos Biacore 2000 y Biacore T100, se utilizó para inmovilizar 8000-10.000 RU de reactivo de captura en las 4 celdillas de flujo del chip sensor. Resumidamente, las superficies de CM-dextrano se activaron por medio de N-hidroxisuccinimida (NHS) 50 mM 3-(N,N-dimetilamino)-propil-N-etilcarbodiimida (EDC) 200 mM 1:1. A continuación se aplicó el reactivo de captura de IgG anti-Fc (20 µg/mL en acetato de sodio 10 mM, pH 4,5) a la superficie, seguido por desactivación de la superficie y bloqueo de los sitios reactivos residuales con etanolamina 1 M (pH 8,5).

El tampón de ejecución empleado era PBS-P [1 x PBS (Sigma P3813), pH 7,4, 0,005% surfactante P20 (Biacore)] para los anticuerpos humanizados. Cada ciclo experimental se componía de los pasos siguientes: 1) los mAbs anti-RAGE se capturaron en las celdillas de flujo 2, 3 ó 4 hasta un nivel de 50-200 RU (dependiendo del antígeno). Todas las medidas se utilizaron como referencia contra la celdilla de flujo 1 que no tenía mAb anti-RAGE alguno capturado. 2) se inyectó antígeno a través de las 4 celdillas de flujo, 240 µL a 80 µL/min. Después de la inyección de antígeno, la disociación se monitorizó durante 600 segundos a 80 µL/min. 3) La superficie de captura anti-Fc se regeneró con glicina de pH bajo. Para las determinaciones cinéticas, las inyecciones de antígeno eran una serie de diluciones al triple desde 30 nM a 0,12 nM (para sRAGE [RAGE (1-331)]) y tampón solo en duplicados aleatorizados.

Los datos se procesaron utilizando software de evaluación Biacore o software Scrubber 2,0 (BioLogic Software). Resumidamente, los datos se referenciaron doblemente, sustrayendo en primer lugar la señal de la celdilla de referencia y sustrayendo en segundo lugar la señal de las inyecciones de tampón solo. Los datos de doble referencia para la serie de inyecciones de RAGE se ajustaron luego globalmente a un modelo de fijación 1:1 (Langmuir), que incluía un término de transferencia de masa, para determinar las constantes cinéticas de velocidad de fijación, k_a y k_d , y la afinidad, y K_D ($k_a = k_{on}$; $k_d = k_{off}$).

Tabla 10: Datos Biacore

11E6 mAb	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (pM)	Desv. estándar del Residuo
h11E6.8	2.5E+07	8.4E-04	33	1,6
h11E6.12	2.0E+07	1.7E-03	83	1,8
h11E6.16	2.8E+07	1.4E-03	50	1,9
mouse 11E6	1.8E+07	1.3E-03	68	1,4

5 Los valores K_D son pM de dos dígitos para la totalidad de los tres mAbs, y no parece existir una distinción significativa entre los tres mAbs en lo que respecta a sus cinéticas de fijación.

En un experimento concurrente, se evaluó el mAb 11E6 original de ratón con su antígeno (sRAGE humano 1-331, V#400) y era también pM K_D de dos dígitos.

10 Se había comunicado previamente que el mAb 11E6 original de ratón era 290 pM. Sin embargo, dichos experimentos iniciales utilizaron un sistema patrón diferente (tampón Biacore HBS-EP+: HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% P20). El tampón de elución puede, por supuesto, afectar a la cinética.

Ejemplo 16: Estudios de volumen de sangre cerebrovascular (CBV) en vivo en ratones Tg2576 viejos

15

16.1. Animales

El modelo de ratón Tg2576 de la enfermedad de Alzheimer (Hsiao et al., 1996) expresa la mutación Sueca de APP (APPK670N, M671L) a nivel elevado bajo control del promotor de la proteína priónica de hámster (PrP). Está perfectamente establecido que esta mutación causa aumentos concomitantes en Ab42 y Ab40 secretados. A medida que los ratones Tg2576 envejecen, aparecen placas que son similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, los ratones Tg2576 desarrollan déficits de comportamiento dependientes de la edad como se evalúa por los tests del laberinto Y, laberinto T, y el laberinto de agua Morris (Hsiao et al. (1996), (Hsiao et al. (1996) Correlative memory deficits, Ab elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 274:99 -102.)

25

16.2. Preparación de anticuerpos

Un anticuerpo de control IgG negativo y el anticuerpo anti-RAGE, 11E6 (ambos de pureza superior a 99%), se sintetizaron en Abbott Laboratories.

30

16.3. Medida de CBV utilizando fMRI

Se realizaron experimentos fMRI-CBV en un imán horizontal 7.0 T/21 cm con una inserción de gradiente de campo magnético de 20 G/cm (Biospec Bruker, Billerica, MA). Ratones Tg2576 viejos (de 19-20 meses de edad) se anestesiaron primeramente con medetomidina (1 mg/kg, i.p.; Pfizer Health, Exton, Pensilvania, USA) + ketamina (75 mg/kg, i.p.; Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA) y se pusieron luego en una jaula de doble bobina para animales

35

pequeños (Insight HT Neuroimaging Systems, LLC, Worcester, MA), que contiene una bobina de volumen para transmisión y una bobina de superficie para recepción. Las tasas de respiración y las formas de onda se monitorizaron continuamente por un transductor de fuerza. La temperatura rectal se monitorizó y se mantuvo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por medio de una almohadilla de agua circulante regulada por retroalimentación. Todas las imágenes se obtuvieron durante la fase de luz. La interacción electromagnética de bobina a bobina se desacopló activamente. Las imágenes anatómicas se adquirieron utilizando la secuencia de pulsos espín-eco rápida mejorada por relajación de adquisición rápida (RARE) con TR = 3 s, TE eficaz = 100 ms, matriz = 256 x 256, FOV = 2,56 cm x 2,56 cm, 9 cortes de 1,0 mm y 4 valores medios. Se utilizó imagen eco-planar (EPI) con eco de gradiente de un solo disparo para la adquisición de imágenes fMRI CBV con TR = 2 s, TE = 13 ms, matriz = 64 x 64, FOV = 2,56 cm x 2,56 cm, y que daba una resolución en el plano = $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$. Se administraron 10 mg de FE/kg de óxido de hierro superparamagnético ultrapequeño (USPIO) como agente de contraste (SHU555C, Schering AG, Berlín, Alemania) por vía intravenosa durante 2 min en una adquisición de imagen de 18 min. Se administraron 11E6 de ratón o IgG 1 inespecífico de ratón (anticuerpo de control) por la vena de la cola 6 min después del agente de contraste utilizando una bomba de jeringuilla (0,1 mL/min durante 1 min) y se detectaron luego los cambios en CBV durante un periodo subsiguiente de 10 min.

16.4. Análisis de los datos fMRI

El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete de software Análisis de Neuroimágenes Funcionales (AFNI) (Cox, 1996). Para identificar el cambio de CBV relativo dependiente del tiempo, se calculó rCBV (t) a partir de los datos brutos en el transcurso del tiempo basados en la relación (Mandeville et al., 1999),

$$rCBV(t) = \ln[s(t)/s_0(t)] / \ln[s_0(t)/s_{pre}] \quad \text{Eq.1}$$

donde s(t) es la intensidad de la señal después de infusión de A β o PBS, So(t) es la señal de la línea base antes de la infusión de A β o PBS, y Spre es la intensidad media de señal antes de la administración del agente de contraste. Los cambios en rCBV en el transcurso del tiempo se liberaron de la tendencia con una función lineal para dar cuenta de la eliminación del agente de contraste de la sangre (Cox, 1996).

Subsiguientemente, la señal de rCBV para cada vóxel en cada ratón se ajustó a un modelo exponencial diferencial no lineal (Eq. 2) que reflejaba la cinética del fármaco (Luo et al., 2004) donde t_0 es el retardo temporal de la respuesta, k es el coeficiente multiplicador, α_1 es la velocidad de eliminación y α_2 la velocidad de absorción.

$$y(t) = k(e^{-\alpha_1(t-t_0)} - e^{-\alpha_2(t-t_0)}) \quad t \geq t_0, \quad \text{Eq. 2.}$$

Los valores finales para t_0 , K, α_1 y α_2 se determinaron automáticamente utilizando AFNI basado en la significación máxima de ajuste del modelo. Los vóxels de rCBV activados se determinaron luego a $p < 0,05$ después de la corrección de Bonferroni. Se registraron los vóxels activados de cerebro entero con aumento de CBV. Dado que los datos no transformados no se confirman con las hipótesis de ANOVA, se empleó la transformación Box-Cox para asegurar la normalidad adecuada y la homogeneidad de la varianza. El efecto de 11E6 es estadísticamente significativo frente a IgG 1 ($p < 0,05$) en ratones TG2576 de 19 meses de edad en el modelo fMRI-CBV.

Los resultados se muestran en la Figura 10 adjunta. Los datos de los autores extienden los resultados obtenidos por Deane (Deane et al., 2003) demostrando que los anticuerpos anti-RAGE policlonales que están direccionados a una diversidad de epítomos dentro de RAGE pueden mejorar la perfusión de sangre cerebral en los ratones APP transgénicos. Los datos de los autores demuestran por primera vez que un anticuerpo monoclonal 11E6
 5 direccionado al dominio C2 dentro de RAGE aumenta la perfusión de sangre cerebral en ratones APP transgénicos. Este efecto está mediado probablemente por fijación de competición de alto nivel de A β a RAGE. Niveles altos de A β existen en el cerebro y el plasma debido a la sobreexpresión de APP humano. El tratamiento de pacientes de AD con 11E6 puede aumentar por tanto la perfusión cerebral en estos pacientes que conduce potencialmente a mejora de las funciones neuronales. Al mismo tiempo, el tratamiento de los pacientes podría monitorizarse potencialmente
 10 siguiendo el flujo de sangre cerebral durante el tratamiento.

Ejemplo 17: Protección de las neuronas del hipocampo contra la escisión de dinamina inducida por A β por el anticuerpo 11E6

15 17.1. Cultivo de neuronas del hipocampo

Se prepararon neuronas de hipocampo de rata conforme a la bibliografía (Goslin y Banker, (1991) Rat Hippocampal Neurons in Low-Density Culture. En: Banker G and Goslin K (ed). Culturing Nerve Cells, MIT Press, Cambridge), con ligera modificación. Resumidamente, los hipocampos de ratas embrionarias de 19 días de edad se disecaron y se
 20 liberaron de las meninges. Se obtuvieron neuronas de hipocampo por tripsilación de tejido (0,1% tripsina/17-20 min/37°C) seguido por trituración con pipetas Pasteur pulimentadas a la llama. Las neuronas del hipocampo se extendieron a una densidad de 0,2-1,0 por 10⁵ células en placas de 6 pocillos o 24 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (placa Biocoat™, BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) utilizando 0,5-3 ml de medio de cultivo exento de suero (medio Neurobasal, suplemento B27, L-glutamina 2 mM; 1% penicilina-estreptomina; Invitrogen, Karlsruhe,
 25 Alemania). Las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ durante al menos dos días y se intercambiaron una tercera parte del medio una vez por semana.

17.2. Escisión de dinamina inducida por A β

30 Se agregó A β conforme a la bibliografía (Kelly, B. L., y Ferreira, A. (2006) J Biol Chem 281(38), 28079-28089; Kelly, B. L., Vassar, R., y Ferreira, A. (2005) J Biol Chem 280(36), 31746-31753) con modificaciones ligeras. Resumidamente, A β 1-40 (American Peptide, Sunnyvale, CA) en medio de cultivo exento de suero a 0,1 mg/mL y se incubó durante 4 d a 37°C. Se incubaron anticuerpos monoclonales anti-RAGE 11E6, un anticuerpo de control monoclonal isotipo IgG 1 dirigido contra KLH (Hemocianina de Lapa Bocallave de Megathura crenulata, Abbott) o
 35 PBS con el A β agregado durante 1 hora a 25°C bajo agitación constante en un volumen final de 225 μ L-1 mL. Las mezclas se añadieron al medio de cultivo dando como resultado una concentración final de A β 5 μ M (calculado como monómero y anticuerpo 2 μ M, respectivamente). Cada tratamiento se realizó por triplicado y se incluyeron pocillos sin adición de A β o anticuerpos como controles adicionales. Las células se cultivaron durante 24 horas más y se inspeccionaron brevemente por microscopía óptica antes de su procesamiento para transferencia Western. El
 40 tratamiento con A β no inducía muerte neuronal manifiesta durante el periodo de incubación.

17.3. Transferencia Western, cuantificación de la escisión de dinamina, y análisis estadísticos

Se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS una sola vez. Las células se lisaron por adición de tampón frío (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; 1% NP-40; 1% Triton X-100; EDTA 2 mM) que contenía cócteles inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche, Mannheim, Alemania). Las células se rascaron y el homogeneizado se centrifugó a 13.000 g a 4°C durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y la concentración total de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando un kit comercial (Bio-Rad, Munich, Alemania). La proteína se diluyó a 1 µg/µL en tampón de carga (Bio-Rad, Munich, Alemania), y se hirvió durante 5 min. Se ejecutaron 25 µg de cada muestra en una SDS-PAGE 4-20% (Invitrogen, Karlsruhe Alemania) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema iBlot (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Alternativamente, las células se lisaron directamente en placas de 96 pocillos, se diluyeron con tampón de carga, y se cargó ¼ a 1/5 de la proteína en SDS-PAGE. Las membranas se bloquearon a la temperatura ambiente durante 1-2 h utilizando 1 x Reactivo de Bloqueo (Roche, Mannheim, Alemania) y se incubaron luego con anticuerpos primarios contra dinamina I (PA-1-660; dilución 1:1000; Affinity BioReagents, Golden, Co) a 4°C durante una noche. Subsiguientemente, se aplicó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante (IgG anti-conejo de cabra, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a las transferencias a la temperatura ambiente durante 1 hora y se detectó utilizando quimioluminiscencia intensificada (Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal West Pico; Pierce, Rockford, IL). Las señales de inmunotransferencia se visualizaron por un sistema VersaDoc (Bio-Rad, Munich, Alemania) y la señal de dinamina I intacta (~ 100 kDa) se cuantificó utilizando software Quantity One (Bio-Rad, Munich, Alemania). Para normalización, las transferencias se sometieron a separación ("stripping") (Tampón de Separación de Materias Volátiles Restore Western Blot, Pierce, Rockford, IL) durante 30 min a 37°C, se lavaron en PBS, y se re-sondaron con un anticuerpo primario dirigido contra tubulina βIII (TuJ-I, dilución 1:1000, Abcam, Cambridge, MA), y anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de burro, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). El valor medio de la expresión normalizada de dinamina I de las células no tratadas con Aβ se ajustó a 100%. Los datos porcentuales de tres experimentos separados se analizaron respecto a significación estadística por un ANOVA de una sola vía (test de Kruskal-Wallis) seguido por el test de Dunn (GrafpadPrism™; Software GraphPad, San Diego, CA).

17.4. El anticuerpo 11E6 anti-RAGE protege las neuronas del hipocampo contra la escisión de dinamina inducida por αB

Se ha demostrado recientemente que Aβ 1-40 agregado induce la escisión de la proteína marcadora sináptica dinamina I en las neuronas del hipocampo (Kelly et al, 2005; Kelly & Ferreira, 2006). En pleno acuerdo con los datos publicados, los autores de la presente invención han observado una disminución acusada en la cantidad de dinamina I intacta (~ 100 kDa) después de incubación de neuronas del hipocampo con Aβ agregado durante 24 h y un aumento concomitante de un producto de escisión de ~ 90 kDa (Fig. 11, panel superior). La pre-incubación de Aβ con el anticuerpo anti-RAGE 11E6 evitaba la escisión a aproximadamente 70%. En contraste, un anticuerpo de control isotipo IgG 1 murino no relacionado con RAGE no proporcionaba protección alguna (Fig. 11, panel superior). El escaneo densitométrico de las muestras triplicadas, la normalización a la cantidad de una proteína de control (tubulina βIII), y el análisis de los datos de tres experimentos independientes revelaron la significación estadística del efecto protector observado (Fig. 11, panel inferior; ANOVA de una vía; p < 0,05).

Ejemplo 18: Efecto del anticuerpo 11E6 sobre la supresión de la transmisión sináptica inducida por globulómeros

18.1. Test A

5 Se prepararon cultivos de cortes organotípicos de hipocampo en un protocolo modificado de Stoppini et al (Journal of Neuroscience Methods, 37, ejemplar 2, abril de 1991, páginas 173-182 "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue" L. Stoppinia, P.-A. Buchsa y D. Muller) y se cultivaron en membranas minicell-CM (Millipore, Billerica, USA) en medio rico en potasio durante 3 días y más tarde en medio neurobasal A suplementado en la interfaz líquido/gas a 34°C/5% CO₂.

Se prepararon cultivos de corte de hipocampo de rata procedentes de ratas Wistar de 9 días y se utilizaron al cabo de 15-16 días in vitro. Los cultivos de corte se incubaron durante una noche con

- 15 - 1 μM de globulómero 1-42,
 - 11E6 0,1 μM (mAb de RAGE ML39-11E6 purificación #4194, muestra #6116) + globulómero 1-42 1 μM
 - control (ultrafiltrado de globulómero + SDS).

20 En el grupo de co-incubación, el anticuerpo se aplicó al medio de cultivo de corte 2 horas antes del globulómero. Se realizaron los registros en una cámara de registro de interfaz bajo perfusión continua con fluido cerebroespinal artificial. Los potenciales postsinápticos de excitación de campo se registraron a partir de la región CA1 después de estimulación de la colateral de Schaffer con pulsos bifásicos a intensidades de voltaje diferentes. La colateral de Schaffer se estimuló con pulsos bifásicos (0,1 ms/fase) utilizando un electrodo bipolar de wolframio 0,5 M (WPI; Salaosta, USA), y se registraron las amplitudes fEPSP con electrodos de vidrio llenos con aCSF (0,7-1,1 Megaohm, 25 GC150F-15, Harvard Apparatus, Hugstetten, Alemania). Las señales se digitalizaron utilizando un instrumento de potencia CED1401 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Reino Unido) y se analizaron utilizando Signal 2.14 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Reino Unido).

30 Los resultados se muestran en la Figura 12A. La aplicación de globulómeros reprimía fuertemente la transmisión sináptica. La co-aplicación de 11E6 0,1 μM invertía completamente los déficits inducidos por los globulómeros. Así pues, 11E6 puede invertir los déficits de la transmisión sináptica inducidos por los globulómeros.

18.2. Test B

35 Se prepararon cultivos de cortes de hipocampo de rata procedentes de ratas Wistar de 9 días y se utilizaron al cabo de 16-18 días in vitro. Los cultivos de corte se incubaron durante una noche con:

- 40 - globulómero 1-42 1 μM
 - mAb IgG1 H35C206 (KLH) 0,1 μM + globulómero 1-42 1 μM
 - control (SDS).

Los registros se realizaron (en fluido cerebroespinal artificial) desde CA1 después de estimulación de la colateral de Schaffer a intensidades diferentes.

Los resultados se muestran en la Figura 12B. La aplicación de globulómeros reprimía fuertemente la transmisión sináptica. La co-aplicación de IgG 1 no invertía los déficits inducidos por globulómeros. Por tanto, el anticuerpo de control IgG no invierte los déficits inducidos por globulómero en la transmisión sináptica a 0,1 μ M.

5 **Ejemplo 19: Análisis in situ del efecto del anticuerpo 11E6 sobre las placas de amiloide en el córtex frontal de los ratones Tg2576**

Para estos experimentos, se utilizaron ratones Tg2576 de 14,5 meses (Hsiao et al., 1996, Science; 274 (5284), 99-102). Los ratones sobreexpresan APP humano con la denominada mutación sueca (K670N/N671L) y formaban depósitos de amiloide β en el parénquima cerebral a aproximadamente los 11 meses. Comenzando a los 12 meses, los ratones se inyectaron con 500 μ g de 11E6 (n = 19) i.p. (intraperitoneal) o un anticuerpo de control IgG 1 (n = 19) una vez por semana durante 12 semanas. Después de la última inyección, los animales se anestesiaron profundamente y se sometieron a perfusión transcardial con solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) para lavar la sangre. Después de ello se separó el cerebro del cráneo y se dividió longitudinalmente. Un hemisferio del cerebro se congeló bruscamente, y el otro se fijó por inversión en paraformaldehído al 4%. El hemisferio fijado por inversión se sometió a crioprotección por impregnación en sacarosa al 30% en PBS y se montó en un microtubo de congelación. El telencéfalo entero se cortó en secciones de 40 μ M que se recogieron en PBS y se montaron en portaobjetos de vidrio Superfrost® Plus (Menzel Glaeser, Braunschweig, Alemania), para el procedimiento de tinción subsiguiente. La tinción de placas de amiloide que contenían A β se realizó con el anticuerpo monoclonal de ratón 6G1 producido contra A β monómero (Barghorn et al., 2005, J. Neurochem, en un dispositivo de tinción automático (Ventana Discovery®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), conforme al protocolo siguiente:

- 25 - las secciones en los portaobjetos de vidrio se secaron completamente al aire y se transfirieron a la máquina Ventana;
- se utilizó un protocolo automático proporcionado por Ventana para el procedimiento cromogénico de diaminobencidina (DAB), que incluía pasos de lavado y bloqueo y tinción con el Kit DAB Map TM; se incluyeron en el protocolo automático por el experimentador recuperación del antígeno e inmunohistoquímica primaria y secundaria;
- 30 - se obtuvo la recuperación de antígeno en presencia de acondicionador #2, (tampón basado en citrato, pH 6,0) a 95°C durante 45 minutos;
- incubación con 6G1 (1:500) en diluyente de anticuerpos (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a 37°C durante 3 horas;
- 35 - incubación con el anticuerpo secundario biotinilado IgG anti-ratón de burro (1:500; Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Reino Unido) a 37°C durante 30 minutos;
- después de la finalización de la tinción automática, se lavaron los portaobjetos en agua normal, se deshidrataron en etanol graduado, se aclararon en XTRA-Solve® (J.T. Baker, Griesheim, Alemania), y se cubrieron con UltraKitt® (J.T. Baker, Griesheim, Alemania).

40 La tinción de las placas se cuantificó en tres secciones histológicas del neocórtex utilizando el sistema de análisis de imágenes ImagePro 5.0. El experimentador desconocía el tratamiento del ratón objeto de análisis y determinó los parámetros siguientes: área del neocórtex, área cubierta con tinción positiva de 6G1 y número de placas teñidas. Estos parámetros eran variables y no estaban distribuidos normalmente. Por tanto, se evaluó estadísticamente una

reducción de la carga de placas por un test U de Mann-Whitney de un solo lado. Los resultados de la tinción del depósito de A β en los ratones PG2576 se muestran en la Figura 13.

5 La evaluación de los depósitos pardos de DAB demostró que el anticuerpo anti-RAGE reducía el número y el área de las placas de amiloide en el neocortex en un 24,5% y 26,8%, respectivamente ($p < 0,1$). La reducción en número y área de las placas alcanzaban la evidencia máxima en el neocortex frontal ($p < 0,05$).

ES 2 577 718 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott GmbH & Co. KG

Abbott Laboratories

<120> Anticuerpos contra el receptor de los productos finales de la glicación avanzada (RAGE) y usos de los mismos

<130> M/49231-PCT

<160> 94

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> VH 7F9

<400> 1

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

<210> 2

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

ES 2 577 718 T3

< 223> VH 7F9 CDR-H1

<400> 2

Asn Tyr Trp Met Asp
1 5

< 210> 3 <211> 19 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH 7F9 CDR-H2 <400> 3

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

< 210> 4 <211> 8 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH 7F9 CDR-H3 <400> 4

Asn Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

< 210> 5 <211> 108 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VL 7F9 <400> 5

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

<210> 6

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> VL 7F9 CDR-L1

<400> 6

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala
1 5 10

<210> 7

< 211> 7

ES 2 577 718 T3

< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> VL 7F9 CDR-L2

<400> 7

Trp Thr Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 8
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> VL 7F9 CDR-L3

<400> 8

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 9
< 211> 120
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> VH 11E6

<400> 9

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

ES 2 577 718 T3

Gly Tyr Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Ser Ile Tyr Ser Glu Glu Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Arg Met Val Thr Ala Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

< 210> 10 <211> 5 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH 11E6 CDR-H1 <400> 10

Asn Phe Gly Met Asn
1 5

< 210> 11 <211> 17 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH 11E6 CDR-H2 <400> 11

Tyr Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Ser Ile Tyr Ser Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15
Gly

< 210> 12 <211> 11 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH 11E6 CDR-H3 <400> 12

Ser Arg Met Val Thr Ala Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

< 210> 13 <211> 108

<212> PRT < 213> Artificial

<220>< 223> mAb VL 11E6

<400> 13

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

<210> 14

< 211> 11

< 212> PRT

ES 2 577 718 T3

< 213> Artificial

<220>

< 223> mAb VL 11E6 CDR-L1

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 15

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> mAb VL 11E6 CDR-L2

<400> 15

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 16

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial <220> <223> mAb VL 11E6 CDR-L3 <400> 16

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

< 210> 17 <211> 120 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> mAb VH 4E5 <400> 17

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

< 210> 18 <211> 5 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> mAb VH 4E5 CDR-H1 <400> 18

ES 2 577 718 T3

Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5

<210> 19 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mAb VH 4E5 CDR-H2

<400> 19

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn His Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Val

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> mAb VH 4E5 CDR-H3

<400> 20

Ser Ala Gly Thr Ala Arg Ala Arg Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mAb VL 4E5

<400> 21

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

ES 2 577 718 T3

< 210> 22 <211> 11 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> mAb VL 4E5 CDR-L1 <400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser Leu Asn
1 5 10

< 210> 23 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> mAb VL 4E5 CDR-L2 <400> 23

Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser
1 5

< 210> 24 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> mAb VL 4E5 CDR-L3 <400> 24

Leu Gln Tyr Ala Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

< 210> 25 <211> 330 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 25

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

ES 2 577 718 T3

Tyr Ile Cys Asn Val 85 Asn His Lys Pro Ser 90 Asn Thr Lys Val Asp Lys
 Lys Val Glu Pro 100 Lys Ser Cys Asp Lys 105 Thr His Thr Cys Pro 110 Pro Cys
 Pro Ala Pro 115 Glu Leu Leu Gly 120 Pro Ser Val Phe Leu 125 Phe Pro Pro
 Lys Pro 130 Lys Asp Thr Leu Met 135 Ile Ser Arg Thr Pro 140 Glu Val Thr Cys
 Val Val Val Asp Val 150 Ser His Glu Asp Pro 155 Glu Val Lys Phe Asn Trp 160
 Tyr Val Asp Gly Val 165 Glu Val His Asn Ala 170 Lys Thr Lys Pro Arg Glu 175
 Glu Gln Tyr Asn 180 Ser Thr Tyr Arg Val 185 Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 His Gln Asp 195 Trp Leu Asn Gly Lys 200 Glu Tyr Lys Cys Lys 205 Val Ser Asn
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro 210 Ile Glu Lys Thr Ile Ser 220 Lys Ala Lys Gly
 Gln Pro Arg Glu Pro 225 Gln Val Tyr Thr Leu Pro 235 Pro Ser Arg Glu Glu 240
 Met Thr Lys Asn 245 Gln Val Ser Leu Thr Cys 250 Leu Val Lys Gly Phe Tyr 255
 Pro Ser Asp Ile 260 Ala Val Glu Trp Glu 265 Ser Asn Gly Gln Pro 270 Glu Asn
 Asn Tyr Lys 275 Thr Thr Pro Pro Val 280 Leu Asp Ser Asp Gly 285 Ser Phe Phe
 Leu Tyr Ser 290 Lys Leu Thr Val 295 Asp Lys Ser Arg Trp 300 Gln Gln Gly Asn
 Val Phe Ser Cys Ser 305 Val Met His Glu Ala Leu 315 His Asn His Tyr Thr 320
 Gln Lys Ser Leu 325 Ser Leu Ser Pro Gly Lys 330

<210> 26

< 211> 106

< 212> PRT <213> Homo sapiens <400> 26

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

< 210> 27 <211> 6276 <212> DNA <213> Artificial <220> <223> Plásmido que codifica OmpA-[RAGE (23-340)]-6HIS

ES 2 577 718 T3

<400> 27

tggcgaatgg gacgcgccct gtacgcggcg attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcgccct cctttcgcct tcttcccttc 120
 ctttctgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccacgcctt gatagacggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaatagt ggactcctgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
 tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
 actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcgggtctgcg attccgactc 720
 gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
 aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
 agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgcg tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgtg ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccgpc gcaggaacac tgcagcgcg tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgtttccccg gggatcgag 1080
 tggtagtaaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
 taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgttgaatt taatcgccgc ctagagcaag acgtttcccc ttgaaatagg ctcataacac 1380
 cccttgatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt tctgcgcgtt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gttgtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaaata tgccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccactcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgtaatcc tgttaccagt ggtctgctcc 1740
 agtggcgata agtctgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcgtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac 1860
 accgaaactg gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
 ccagggggaa acgcttggtt tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
 cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagccctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ctttttgctc acatgttctt tcctgcgta 2160
 tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc 2220
 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcaggaagc cggaaagagcg cctgatgagg 2280
 tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatgggtc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgcccga tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgtgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
 gctccccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcataccgca aacgcgcgag gcagctcggg taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atcgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gctggtctc tgataaagcg ggcctatgta agggcggttt tttcctgttt 2700
 ggtcactgat gcctcgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880

ES 2 577 718 T3

```

tcaatgccag cgcttcgta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcccaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggctct cgcgaaaaat gaccagagc getgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccc 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caaggcctc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgctt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatgtcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcatg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaaacgat ccctcattca 3900
gcatttgcat ggttggttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggtgaaat ttgattgca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccgaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctgttc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcaccag ttgatcgcg cgagatttaa tcgcccgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggcccagact ggaggtggca acgcaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgg 4440
ccacgcggtt gggaaatgaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcagat gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccggtgagca ccgcccgcg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagctcc 4800
ccggccacgg ggctgccc ataccacgc ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttcccacg ggtgatgctg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
gcgcccgtga tgcggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatcga tctgatccc 4980
gcgaaattaa tacgactcac tatagggaa ttgtgagcgg ataacaattc ccctctagaa 5040
ataatttgt ttaactttaa gaaggagata tacatatgaa aaagacagct atcgcgattg 5100
cagtggcact ggctggtttc gctaccgtag cgcaggccgc tcaaaacatc acagcccgga 5160
ttggcgagcc actggtgctg aagtgtaagg gggcccccga gaaaccaccc cagcggctgg 5220
aatggaaact gaacacagc cggacagaag cttggaaggt cctgtctccc cagggaggag 5280
gccccgggga cagtgtgct cgtgtccttc ccaacggctc cctcttctt ccggtgtcg 5340
ggatccagga tgaggggatt ttccggtgcc aggcaatgaa caggaaatgga aaggagacca 5400
agtccaacta ccgagctcgt gtctaccaga ttcttgggaa gccagaaatt gtagattctg 5460
cctctgaact caggctggt gtcccaata aggtggggac atgtgtgtca gagggaagct 5520
accctgcagg gactcttagc tggcacttgg atgggaagcc cctgtgtcct aatgagaagg 5580
gagtatctgt gaaggaacag accaggagac accctgagac agggctcttc acactgcagt 5640
cggagctaat ggtgaccca gccgggggag gagatccccg tcccacttc tcctgtagct 5700
tcagcccagg cttccccga caccggcctc tgcgcacagc ccccatccag cccctgtct 5760
gggagcctgt gcctctggag gaggccaat tgggtggtgga gccagaaggt ggagcagtag 5820
ctcctggtgg aaccgtaacc ctgacctgtg aagtccctgc ccagccctct cctcaaatcc 5880
actggatgaa ggatggtgtg cccttgcccc ttccccccag ccctgtgctg atctccctg 5940
agatagggcc tcaggaccag ggaacctaca gctgtgtggc caccatttc agccacgggc 6000
cccaggaag ccgtgctgtc agcatcagca tcatgaacc aggcgaggag gggccaactg 6060
caggctctgt gggaggatca gggctgggaa ctaccacca ccaccaccac tgactcgagc 6120
accaccacca ccaccactga gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg 6180
ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggcctctaaa cgggtcttga 6240
gggtttttt gctgaaagga ggaactatat ccggat 6276

```

ES 2 577 718 T3

<210> 28
 < 211> 5617
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Plásmido que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (24-129)]
 <400> 28

```

<400> 28
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg      60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcgccgt cctttcgttt tcttcccttc      120
ctttctgcgc acgttcgccg gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg      180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc      240
acgtagtggg ccatacgcctt gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt      300
ctttaatagt ggactcttgt tccaactcgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc      360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggccatttgg ttaaaaaatg agctgattta      420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaaa attaacgttt acaatttcag gtggcacttt      480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta      540
tcgcctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat      600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa      660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc      720
gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga      780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc      840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcaactcga tcaaccaaac      900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgtg ttaaaaggac      960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaaacac tgccagcga tcaacaatat      1020
ttcacctcga atcaggatat tcttctaata cctggaaatg tgttttcccg gggatcgcag      1080
tggtagtaaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca      1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac      1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg      1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca      1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaaatagg ctcataacac      1380
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgacca aatcccttaa      1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga      1500
gatccttttt tctcgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg      1560
gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc      1620
agagcgcaga taccaaatac tgccttctta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag      1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc      1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg      1800
cagcgtcggg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac      1860
accgaactga gatacttaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga      1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gaggagcctt      1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag      2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg      2100
gcctttttac ggttctctgg cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgta      2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgatttacc gcctttgagt gagctgata cgctcggcgc      2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcaggaag cggaaagagc cctgatgagg      2280
tattttctcc ttacgatctc gtgcgggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta      2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg      2400
    
```

ggatcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac gggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgtga gtttctccag 2640
 aagcgtaaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt tttctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcag ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagaggt atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgaggggt aaacaactgg cggatggat gcggcgggac cagagaaaa tcaactaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgtgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgcctag gtcgcagacg ttttgacga 3060
 gcagtgcctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgtaaccag taaggcaacc 3120
 ccggaccctt agccgggtcc tcaacgacag gacgacgac atgcgcacc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataattggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcagaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcactcgtgc 3300
 gctccagcga aagcggctct cgcggaaaa gaccagagc gctgccgga cctgtcctac 3360
 gaggttgatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcacc ggtcgagatc ccgggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactc cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagcgg gtttgcgtat 3600
 ttggcgccag ggtgggtttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
 ccgcttgccc ctgagagaggt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcagcgaa 3720
 aatcctgttt gatgggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtctg 3780
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcatg 3840
 cgccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgaggt gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcatt ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgcca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccc 4020
 agacagaact taatgggccc gtaaacagcg cgatttgcct gtgacccaat gcaccagat 4080
 gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaa aatactgttg atgggtgtct 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
 catcctggct atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcttcc taccatcgac accaccacgc 4320
 tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tgcggcgac aatttgcgac ggcgctgca 4380
 gggccagact ggaggtgga acgccaatca gcaacgactg tttgcccc agttgtgtg 4440
 ccacgcggtt gggaaatgaa ttacgtccc ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
 tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
 cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
 tctcgacgct ctcccctatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
 ccgttagagca ccgcccggcg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
 ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
 cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg gcagcaac cgacactgtg 4920
 gcgcccgtga tgcggcccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
 aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaataa 5040
 ttttgttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
 agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat atgcaaaaca tcacagcccg gattggcgag 5160
 ccactgggtc tgaagtgtaa gggggccccc aagaaccac cccagcggtt ggaatggaaa 5220
 ctgaacacag gccggacaga agcttggaaag gtcctgtctc cccagggagg aggccctgg 5280
 gacagtgtgg ctctgttctt tcccaacgcg tccctcttcc ttccggctgt cgggatccag 5340
 gatgagggga ttttccgggt ccaggcaatg aacaggaatg gaaaggagac caagtccaac 5400
 taccagatcc gtgtctacca gattcctggg aagccagaaa ttgtagattc ttgactcgag 5460
 caccaccacc accaccactg agatccggct gctaacaag cccgaaagga agctgagttg 5520
 gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccttg gggcctctaa acgggtcttg 5580
 aggggttttt tgcgaaaagg aggaactata tccggat 5617

< 211> 5932
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Plásmido que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (24-234)]
 <400> 29

```

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg    60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcggccgct cctttcgctt tcttcccttc    120
ctttctgcgc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg    180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc    240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt    300
ctttaatagt ggactcttgt tccaactcgg aacaacactc aacctatct cggtctattc    360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggccatttgg ttaaaaaatg agctgattta    420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt    480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta    540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat    600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa    660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc    720
gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga    780
aatcaccatg agtgacgact gaatccgggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc    840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaacaaac    900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac    960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
ttcacctga atcaggataa tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag    1080
tggtagtaaa catgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca    1140
taaatccgtg cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac    1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg    1260
tcgcaccctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca    1320
tgttggaatt taatcgcgcg ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac    1380
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa    1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaaag atcttcttga    1500
gatccttttt tcttcgctgc aatctgctgc ttgcaaaaaa aaaaccacc gctaccagcg    1560
gtggtttggt tgccgataca agagctacca actcttttcc cgaaggtaac tggcttcagc    1620
agagcgcaga taccaaaata tgtcttctta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag    1680
aactctgtag caccgctac atacctgct ctgctaatec tgttaccagt ggtgctgccc    1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg    1800
cagcgtcctg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac    1860
accgaaactg gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga    1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt    1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag    2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg    2100
gcctttttac ggttctctgc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgctgta    2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc    2220
agccgaacga ccgagcgagc cgagtcagtg agcagggaag cggaaagagcg cctgatgcg    2280
tattttctcc ttacgatctt gtgcgggtatt tcacaccgca tatatgggtc actctcagta    2340
caatctgctc tgatgccga tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg    2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac gggcttgtct    2460
gtctccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag    2520
gttttcaccg tcataccgga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc    2580
    
```

gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atcccgtcc agctcgttga gttttccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgtcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggg aaacaactgg cggatggat gcggcgggac cagagaaaa tcaactaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagatcc 2940
tgcatgacag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttcccggttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgacga 3060
gcagtgcgtt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgcagcct agccgggtcc tcaacgacag gacacgatc atgcgcaccg gtggggccgc 3180
catgccggcg ataattgcct gcttctcgc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcagaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggctct gcgcgaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgctgt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgctggccc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatgggtggt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcagc gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcac ggtttgttga aaaccggaca tggcaactca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccc 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaa aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatgcac accaccacgc 4320
tggcaccagc ttgatcggcg cgagatttaa tcgcccgcac aatttgcgac ggcgctgca 4380
gggacagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttcccgcac agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaaatgaa ttcagctccg ccacgcgcgc ttcactttt tcccgcgttt 4500
tcgagaaaac gtggctggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccctatg cgaactctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac cataccacgc ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgcgggtga tgcggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccc ctagaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat atgcaaaa tcacagcccg gattggcgag 5160
ccactggtgc tgaagtgtaa gggggccccc aagaaaccac cccagcggct ggaatggaaa 5220
ctgaacacag gccggacaga agcttggaag gtcctgtctc cccagggagg aggccctgg 5280
gacagtgtgg ctgctgtcct tcccacggc tccctcttcc ttcgggctgt cgggatccag 5340
gatgagggga ttttccggtg ccagcaatg aacaggaatg gaaaggagac caagtccaac 5400
taccagctcc gtgtctacca gattcctggg aagccagaaa ttgtagattc tgcctctgaa 5460
ctcagcgctg gtgttcccaa taagtggtgg acatgtgtgt cagagggagag ctaccctgca 5520
gggactctta gctggcaact ggatgggaag cccctgtgtc ctaatgagaa gggagtatct 5580
gtgaagggaac agaccaggag acaccctgag acagggctct tcacactgca gtcggagcta 5640
atggtgaccc cagcccgggg aggagatccc cgtcccacct tctcctgtag cttcagccca 5700
ggccttcccc gacaccgggc cttgcgcaca gcccccattc agccccgtgt ctgggagcct 5760
gtgccttgac tcgagcacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga 5820
aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc ctttggggcc 5880
tctaaccggg tcttgagggg tttttgtctg aaaggaggaa ctatatccg at 5932

<210> 30
 < 211> 6238
 < 212> DNA
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Plásmido que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (24-336)]
 <400> 30

```

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg      60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcgcgccct cctttcgctt tcttcccttc      120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg      180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc      240
acgtagtggg ccategccct gatagacggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt      300
ctttaatagt ggactcttgt tccaactcgg aacaacactc aacctatctc cgtctatttc      360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggccatttgg ttaaaaaatg agctgattta      420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt      480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta      540
tcgcctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat      600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa      660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctcgc attccgactc      720
gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataagggta tcaagtgaga      780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc      840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac      900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgtcg ttaaaagjac      960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcagaaacac tgccagcgca tcaacaatat     1020
tttcaccgga atcaggatata tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag     1080
tggtagtaaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca     1140
taaatccgtg cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac     1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg     1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca     1320
tgttgaattt taatcgcgcc cttagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac     1380
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa     1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga     1500
gatccttttt tctgcgcgct aatctgctgc ttgcaaaaca aaaaaccacc gctaccagcg     1560
gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc     1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agtttagcca ccacttcaag     1680
aactctgtag caccgectac atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggtctctgcc     1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg     1800
cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagcca gcttgtagcg aacgacctac     1860
accgaaactg gatacctaca gcgtgagcta tgagaaaagc ccacgcttcc cgaagggaga     1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gaggggagctt     1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag     2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg     2100
gcctttttac ggttctctgc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctcgctta     2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc     2220
agccgaacga ccgagcgacg cgagtcagtg agcagggaa ggaagagcg cctgatgcgg     2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggattt tcacaccgca tatatgggtc actctcagta     2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg     2400
ggctcatggt gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct     2460
    
```

ES 2 577 718 T3

gctccccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatacccca aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgtaata gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggctactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcctg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgcctag gtcgcagacg ttttgacgca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgtaaccagg taaggcaacc 3120
ccgcagacct agcgggtccc tcaacgacag gagcacgac atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataattggctt gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcagaa 3240
ggcttgagcg agggcggtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggcga tcactcgtgc 3300
gtccacgca aagcggctct cgcggaaaaa gaccagagc gctgccgca cctgtcctac 3360
gagttgatgc ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcacc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagcgg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtgggtttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgctggccc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcagcgcaa 3720
aatcctgttt gatgggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atccccactc cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcatgt 3840
gcgccagcgc catctgatgc ttggcaacca gcacgcaggt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gtccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaaa aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggct atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccagc 4320
tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggcccagct ggagggtgca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcgggt gggaaatgtaa ttcagctccc ccacgcgcgc ttccactttt tcccgcgttt 4500

ES 2 577 718 T3

tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
 ctccggggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcagat gtgtccggga 4680
 tctcgacgct ctcccctatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
 ccgttgagca ccgccccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgc caacagtccc 4800
 ccggccacgg gccctgccac cataccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
 cgagcccgat ctccccatc ggtgatgctg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
 gcgccggtga tggcggccac gatgctccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
 aattaatacg actcaactata ggggaattgt gaggggataa caattcccct ctagaataa 5040
 tttgttttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
 agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat atgcaaaaca tcacagcccg gattggcgag 5160
 ccaactggtgc tgaagtgtaa gggggccccc aagaaccac cccagcggct ggaatggaaa 5220
 ctgaacacag gccggacaga agcttgggag gtctctgtct cccagggagg aggcccttg 5280
 gacagtgtgg ctctgtctct tcccacggc tccctcttcc ttccggctgt cgggattccag 5340
 gatgagggga ttttccgggt ccaggcaatg aacaggaatg gaaaggagac caagtccaac 5400
 taccgagtcg gtgtctacca gattcctggg aagccagaaa ttgtagattc tgcctctgaa 5460
 ctacggctgt gtgttcccaa taaggtgggg acatgtgtgt cagaggggag ctacctgca 5520
 gggacttcta gctggcactt ggatgggag cccctggtgc ctaatgagaa gggagtatct 5580
 gtgaaggaa acagaccagg acacctgag acagggctct tcacactgca gtcggagcta 5640
 atggtgacct cagcccgggg aggagatccc cgtcccacct tctcctgtag cttcagccca 5700
 ggccttcccc gacaccgggc cttgcgcaca gccccatcc agcccctgt ctggggagcct 5760
 gtgctctcgg aggaggtcca attggtggtg gagccagaag gtggagcagt agctcctggt 5820
 ggaaccgtaa cctgacctg tgaagtccct gccagccct ctctcaaat ccaactggatg 5880
 aaggatggtg tgcccttgc cttcccccc agccctgtgc tgatcctccc tgagataggg 5940
 cctcaggacc agggaaacct cagctgtgtg gccaccatt ccagccacgg gccccaggaa 6000
 agccgtgctg tcagcatcag catcatcga ccaggcgagg aggggccaac tgcaggctct 6060
 gtgggaggat catgactcga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgtaacaaa 6120
 gcccaaaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt 6180
 ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggat 6238

<210> 31

< 211> 5614

< 212> DNA< 213> Artificial

<220>

< 223> Plásmido que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (130-234)]

<400> 31

ES 2 577 718 T3

```

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg      60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcgccct agcgcgccct cctttcgctt tcttcccttc      120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg      180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc      240
acgtagtggg ccacgcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt      300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctatttc      360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta      420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt      480
tcggggaatg gtgcgcggaa ccctatttg tttatTTTT taaatacatt caaatatgta      540
tcgcctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat      600
tcatatcagg attatcaata ccataTTTT gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa      660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctgcta tcggtctgcy attccgactc      720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga      780
aatcaccatg agtgacgact gaatccgggt agaattggcaa aagtttatgc atttctttcc      840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac      900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctt ttaaaaggac      960
aattacaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat     1020
tttcacctga atcaggata tcttctaata cctggaatgc tgttttccg gggatcgag     1080
tggtagtaaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca     1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac     1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg     1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca     1320
tgttggaatt taatcgggc cttagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaac     1380
ccctgttatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgacca aatcccttaa     1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga     1500
gatecttttt tcttgcgctg aatctgctgc ttgcaaaaca aaaaaccacc gctaccagcg     1560
gtggtttgtt tgccgatca agagctacca actcttttcc cgaaggtaac tggcttcagc     1620
agagcgcaga taccaataac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag     1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaattc tgttaccagt ggtgctgcc     1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg     1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac     1860
accgaactga gatacttaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga     1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt     1980
ccaggggaa acgcctggtt tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag     2040

```

ES 2 577 718 T3

cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttccctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
 agccgaacga ccgagcgag cgagttagtg agcgaggaag cggaaagagc cctgatgcgg 2280
 tattttctcc ttacgatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacaact ccgctatgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgcct 2460
 gctccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttaccg tcataccgca aacgcgcgag gcagctgagc taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atcccgctcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgtaaat gctcggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaa tcaactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgcctag gtcgcagacg ttttgacgca 3060
 gcagtgcctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgtaaccag taaggcaacc 3120
 ccgacagcct agccgggtcc tcaacgacag gacacgatc atgcgcacc ccggggccgc 3180
 catgccggcg ataattggct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtacgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggcga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctcc cgccgaaaat gaccagagc gctgccgca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcccga 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caaggcctc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
 tggcgccag ggtggttttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
 ccgctggccc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccga ctcggtaatg gcgcgattg 3840
 cgccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcattcgagt gggaaagatg ccctcattca 3900
 gcatttgcatt ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccc 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgcgt gtgacccaat gcgaccagat 4080

ES 2 577 718 T3

```

gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcga tagttaatga tcagccact gacgcgttc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gttcgcgcgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggcagact ggaggtggca acgcaatca gcaacgactg tttgccgcc agttgtgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttcactttt tcccgcgttt 4500
tcgagaaac gtggctggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttcggggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccctatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttagagca ccgccgccgc aaggaaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac cataccacgc ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gvcgctgga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatagc actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaataa 5040
ttttgttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcgccc tggctccgcg cggcagccat atggcctctg aactcacggc tgggtttccc 5160
aataaggtgg ggacatgtgt gtcagagga agtaccctg cagggaactc tagctggcac 5220
ttgatggga agcccctggt gcctaagag aaggagatc ctgtgaagga acagaccagg 5280
agacaccctg agacagggct cttcacactg cagtcggagc taatggtgac cccagcccgg 5340
ggaggagatc cccgtcccac cttctctgt agcttcagcc caggccttcc cgcacaccgg 5400
gccttgcgca cagccccat ccagcccgt gtctgggagc ctgtgccttg actcgagcac 5460
caccaccacc accactgaga tccggctgct aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct 5520
gctgccaccg ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg 5580
ggtttttgc tgaaggagg aactatatcc ggat 5614

```

<210> 32

< 211> 5920

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>< 223> Plásmido que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (130-336)]

<400> 32

ES 2 577 718 T3

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaaagcgc gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcgcgccct cctttcgctt tcttcccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttcccgc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
 gtccgattt agtgctttac ggcacctcga cccccaaaaa cttgattagg gtgatggtc 240
 acgtagtggg ccacgcctc gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
 ctttaaatagtg gactctttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggccatttgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaaa attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 tcgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
 tcatacagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
 actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggctcgcg attccgactc 720
 gtccaacatc aatacaacct attaatcttc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
 aatcaccatg agtgacgact gaatccgggt agaattggcaa aagtttatgc atttcttttc 840
 agacttgctc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgcg tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgcgt ttaaaaggac 960
 aattacaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcga tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag 1080
 tggtagataa ccatgatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
 taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgttggaaat taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
 ccttctgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt tctcgcgctg aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actccttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
 accgaaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
 ccagggggaa acgcctggtt tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
 cgtcagtttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcttggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctcgcgtta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gccttgagt gagctgatac cgtcgcgccg 2220

ES 2 577 718 T3

agcgaaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
 tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccga tagttaagcc agtatacaact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccccgac gggcttgctc 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcactaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gctcgtcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt tttctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatt ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgrra atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatgggtgca gggcgctgac ttccgctgtt ccagacttta 3000
 gaaacacgag aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgacga 3060
 gcagtcgctt cacgttctct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgcccagct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcacc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataattggct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcagaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacagccgca tcactgtcgc 3300
 gctccagcga aagcgttctc cgcgaaaaat gaccagagc gctgcggca cctgtcctac 3360
 gagttgatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagggc gtttgcgtat 3600
 tgggcgcccag ggtgggtttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
 ccgcttggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatgggtgggt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
 atccccactc cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcatg 3840
 cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcatt ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
 gctccagccc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaaa aatactgtt atgggtgtct 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aaccccggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
 catcctggtc atccagcga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260

ES 2 577 718 T3

```

tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggcccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg ttgcccgc agttgtgtg 4440
ccacgcggtt gggaaatgtaa ttcagctccg ccatcgcgcg ttcactttt tcccgcgtt 4500
tcgcagaaac gtgctggcc ttgttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatgtagt aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttcggggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttagaca ccgcgcccgc aaggaaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac cataccacgc ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtag gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
gvcgctgga tgccggccac gatgctccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aataatacgc actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctgaaataa 5040
ttttgtttaa cttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat atggcctctg aactcacggc tgggttccc 5160
aataaggtgg ggacatgtgt gtcagagggga agctaccctg cagggactct tagctggcac 5220
ttggatggga agccccgtgt gcctaagtag aaggagtagt ctgtgaagga acagaccagg 5280
agacaccctg agacagggct cttcacactg cagtcggagc taatggtgac cccagcccgg 5340
ggaggagatc cccgtcccac cttctcctgt agcttcagcc caggccttcc ccgacaccgg 5400
gccttgcgca cagccccat ccagccccgt gctcgggagc ctgtgctctt ggaggaggtc 5460
caattgggtg tggagccaga aggtggagca gtagctcctg gtggaaccgt aacctgacc 5520
tgtgaagtcc ctgccagcc ctctcctcaa atccactgga tgaaggatgg tgtgccctg 5580
ccccctccc ccagccctgt gctgatcctc cctgagatag ggcctcagga ccaggaacc 5640
tacagctgtg tggcaccaca ttccagccac gggcccagc aaagccgtgc tgtcagcatc 5700
agcatcatcg aaccaggcga ggaggggcca actcgaggct ctgtgggagg atcatgactc 5760
gagcaccacc accaccacca ctgagatccg gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag 5820
ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc 5880
ttgaggggtt ttttgctgaa aggaggaact atatccggat 5920

```

<210> 33

< 211> 5605

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

< 223> Plásmido que codifica 6HIS-(Thr)-[RAGE (235-336)]

<400> 33

```

<4UU> JJ
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaacgcgc gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatacgcct gatagacggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacggt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaatth aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctcgc attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccgggt agaattggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgtg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaaacac tgccagcga tcaacaatat 1020
ttcacctga atcaggata tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag 1080
tggtagtaaa ccatgatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaatccgtg cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat ctagatattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttgaatth taatcgcggc cttagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaac 1380
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatccttttt tcttgccgct aatctgctgc ttgcaaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccgatca agagctacca actcttttcc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaataac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccaactcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtctgtctt taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcgtcggg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaaagc ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aagcgggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gaggaggctt 1980
ccagggggaa acgctgggta tctttatagt cctgctgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100

```

ES 2 577 718 T3

gccttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggagagcgc cctgatgcgg 2280
 tattttctcc ttacgcattc gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccga tagttaagcc agtatacaact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccccgac gggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcataccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggct 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atcccgctcc agctcgttga gttttccag 2640
 aagcgttaat gctcggcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt tttctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccygt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggataggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatgggtgca gggcgctgac ttccgcgctt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcaaga 3060
 gcagtcgctt cagcttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgcccagct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcaccg gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcggtga agattccgaa taccgcaagc gacaggcga tcctcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctct cgcgaaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaaggctct caaggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagcgc gtttgcgtat 3600
 tgggcgccag ggtgggtttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
 ccgcttgccc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatgggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcatg 3840
 cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgagc gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgta 3960
 tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccc 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
 gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaaa aatactgttg atgggtgtct 4140

ES 2 577 718 T3

```

ggtcagagac atcaagaaat aacgccgga cattaagtca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgttttacag gcttcgacgc cgttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcaccagc ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgctgca 4380
gggcagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcgggt ggaatgtaa ttcagctccg ccacgcgcgc tccaccttt tcccggttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgat aacgttactg gttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttcggggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccctatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgc caacagtccc 4800
cggccacggg ggcctgccac cataccacgc ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgcccgtga tggcggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcggcc tggctccgcg cggcagccat atgctggagg aggtccaatt ggtggtggag 5160
ccagaagggt gagcagtagc tcctggtgga accgtaacc tgacctgtga agtccctgcc 5220
cagccctctc ctcaaatcca ctgatgaag gatggtgtgc ccttgccct tccccagc 5280
cctgtgctga tcctccctga gataggcct caggaccagg gaaacctacag ctgtgtggcc 5340
accattcca gccacgggcc ccaggaaagc cgtgctgtca gcatcagcat catcgaacca 5400
ggcaggagg ggccaactgc aggtctgtg ggaggatcat gactcgagca ccaccaccac 5460
caccactgag atccggctgc taacaaagcc cgaaggaag ctgagttggc tgctgccacc 5520
gctgagcaat aactagcata accccttggg gcctctaac gggctttgag gggtttttg 5580
ctgaaaggag gaactatct cggat 5605

```

<210> 34

< 211> 345

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Proteina RAGE #1

<400> 34

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1           5           10           15

```

```

Thr Val Ala Gln Ala Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro
20           25           30

```

ES 2 577 718 T3

Leu Val₃₅ Leu Lys Cys Lys Gly Ala₄₀ Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu
 Glu Trp₅₀ Lys Leu Asn Thr Gly₅₅ Arg Thr Glu Ala₆₀ Trp Lys Val Leu Ser
 Pro Gln Gly Gly Gly Pro₇₀ Trp Asp Ser Val Ala₇₅ Arg Val Leu Pro Asn₈₀
 Gly Ser Leu Phe Leu₈₅ Pro Ala Val Gly Ile₉₀ Gln Asp Glu Gly Ile₉₅ Phe
 Arg Cys Gln Ala₁₀₀ Met Asn Arg Asn Gly₁₀₅ Lys Glu Thr Lys Ser₁₁₀ Asn Tyr
 Arg Val₁₁₅ Arg Val Tyr Gln Ile Pro₁₂₀ Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser
 Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly₁₃₅ Val Pro Asn Lys Val₁₄₀ Gly Thr Cys Val
 Ser Glu Gly Ser Tyr Pro₁₅₀ Ala Gly Thr Leu Ser₁₅₅ Trp His Leu Asp Gly₁₆₀
 Lys Pro Leu Val₁₆₅ Pro Asn Glu Lys Gly Val₁₇₀ Ser Val Lys Glu Gln Thr₁₇₅
 Arg Arg His Pro₁₈₀ Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met₁₉₀
 Val Thr Pro₁₉₅ Ala Arg Gly Gly Asp₂₀₀ Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser
 Phe Ser₂₁₀ Pro Gly Leu Pro Arg₂₁₅ His Arg Ala Leu Arg₂₂₀ Thr Ala Pro Ile
 Gln Pro Arg Val Trp Glu₂₃₀ Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val₂₄₀
 Val Glu Pro Glu Gly₂₄₅ Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu₂₅₅
 Thr Cys Glu Val₂₆₀ Pro Ala Gln Pro Ser₂₆₅ Pro Gln Ile His Trp Met Lys₂₇₀
 Asp Gly Val₂₇₅ Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro₂₈₅
 Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His₂₉₀
 Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val₃₁₀ Ser Ile Ser Ile Ile₃₂₀
 Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly₃₃₅
 Leu Gly Thr His₃₄₀ His His His His His His₃₄₅

<210> 35

< 211> 127

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Proteína RAGE #2

<400> 35

ES 2 577 718 T3

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

<210> 36

< 211> 232

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Proteína RAGE #3

<400> 36

-

ES 2 577 718 T3

Arg Gly Ser His Met Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu
 20 25 30
 Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu
 35 40 45
 Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro
 50 55 60
 Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg
 85 90 95
 Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg
 100 105 110
 Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala
 115 120 125
 Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser
 130 135 140
 Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys
 145 150 155 160
 Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg
 165 170 175
 Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val
 180 185 190
 Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe
 195 200 205
 Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
 210 215 220
 Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro
 225 230

< 210> 37 <211> 334 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Proteína RAGE #4 <400> 37

ES 2 577 718 T3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu
 20 25 30
 Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu
 35 40 45
 Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro
 50 55 60
 Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg
 85 90 95
 Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Gln Thr Lys Ser Asn Tyr Arg
 100 105 110
 Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala
 115 120 125
 Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser
 130 135 140
 Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys
 145 150 155 160
 Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg
 165 170 175
 Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val
 180 185 190
 Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe
 195 200 205
 Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
 210 215 220
 Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val
 225 230 235 240
 Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
 245 250 255
 Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp
 260 265 270
 Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu
 275 280 285
 Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser
 290 295 300
 Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu
 305 310 315 320
 Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
 325 330

<210> 38

< 211> 126

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Proteína RAGE #5

<400> 38

ES 2 577 718 T3

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

<210> 39

< 211> 228

< 212> PRT< 213> Artificial

<220>< 223> Proteína RAGE #6

<400> 39

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys
 20 25 30
 Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser
 35 40 45
 Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser
 50 55 60
 Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro
 85 90 95
 Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu
 100 105 110
 Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu
 115 120 125
 Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly
 130 135 140
 Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln
 145 150 155 160
 Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro
 165 170 175
 Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser
 180 185 190
 Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val
 195 200 205
 Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser
 210 215 220
 Val Gly Gly Ser
 225

ES 2 577 718 T3

<210> 40
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>

< 223> Proteina RAGE #7 <400> 40

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

< 210> 41 <211> 330 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Mutante de la región constante Ig gamma-1 <400>
 41

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

ES 2 577 718 T3

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 42

< 211> 326

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

ES 2 577 718 T3

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

<210> 43

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> VH7-4.1/JH6 FR1

<400> 43

ES 2 577 718 T3

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

<210> 44
< 211> 14
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> VH7-4.1/JH6 FR2

<400> 44

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

<210> 45
< 211> 32
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> VH7-4.1/JH6 FR3

<400> 45

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

<210> 46
< 211> 11
< 212> PRT <213> Artificial <220> <223> vH7-4.1/JH6 FR4 <400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

< 210> 47 <211> 30 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH1-2/JH6 FR1 <400> 47

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

< 210> 48 <211> 32 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH1-2/JH6 FR3 <400> 48

ES 2 577 718 T3

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

< 210> 49 <211> 23 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> 1-12/L5/JK2 FR1 <400> 49

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

< 210> 50 <211> 15 <212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> 1-12/L5/JK2 FR2

<400> 50

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

<210> 51

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> 1-12/L5/JK2 FR3

<400> 51

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

<210> 52

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> 1-12/L5/JK2 FR4

<400> 52

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

ES 2 577 718 T3

<210> 53
 < 211> 23
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> 3-15/L2/JK2 FR1
 <400> 53

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

<210> 54
 < 211> 15
 < 212> PRT<
 213> Artificial

<220>
 < 223> 3-15/L2/JK2 FR2 <400> 54

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

< 210> 55 <211> 32 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> 3-15/L2/JK2 FR3 <400> 55

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

< 210> 56 <211> 120 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH 11E6.1-GL <400> 56

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

ES 2 577 718 T3

< 210> 57
 <211> 120
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> VH 11E6.2-GL
 <400> 57

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

<210> 58
 < 211> 108
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>Ç
 < 223> VL 11E6.1-GL
 <400> 58

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

ES 2 577 718 T3

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

<210> 61

< 211> 331

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Fragmento hus RAGE

ES 2 577 718 T3

<400> 61

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15
Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30
Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45
Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60
Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80
Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95
Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110
Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125
Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
130 135 140
Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
145 150 155 160
Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
165 170 175
Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
180 185 190
Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
195 200 205
Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
210 215 220
Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
225 230 235 240
Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
245 250 255
Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
260 265 270
Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
275 280 285
Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
290 295 300
His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
305 310 315 320
Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly
325 330

<210> 62

< 211> 120

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> VH h11E6.1

ES 2 577 718 T3

<400> 62

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

< 210> 63 <211> 108 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VL h11E6.1 <400> 63

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

< 210> 64 <211> 108 <212> PRT <213> Artificial <220> <210> 66 <211> 108 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VL h11E6.4 <400> 66>

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

ES 2 577 718 T3

< 210> 67 <211> 120 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> VH h11E6.5 <400> 67

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

<223> VL h11E6.2

<400> 64

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

<210> 65

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>< 223> VL h11E6.3

<400> 65

ES 2 577 718 T3

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

<210> 68
 < 211> 120
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>< 223> VH h11E6.9

<400> 68

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

<210> 69
 < 211> 120
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>< 223> vH h11E6.13

ES 2 577 718 T3

<400> 69

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

< 210> 70 <211> 31 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> NtermR31 <400> 70

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15
 Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

< 210> 71 <211> 30 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Péptido 1 <400> 71

Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn
 20 25 30

< 210> 72 <211> 30

<212> PRT

< 213> Artificial

<220>< 223> Péptido 2

<400> 72

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

<210> 73

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial

ES 2 577 718 T3

<220>

< 223> Péptido 3

<400> 73

Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro
 1 5 10 15

Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 20 25 30

<210> 74

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Péptido 4

<400> 74

Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp Lys Leu Asp Gly Lys
 20 25 30

<210> 75

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>< 223> Péptido 5

<400> 75

Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu
 1 5 10 15

Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln
 20 25 30

< 210> 76 <211> 30 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Péptido 6 <400> 76

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

Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg
 20 25 30

< 210> 77 <211> 30 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Péptido 7 <400> 77

ES 2 577 718 T3

Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val
1 5 10 15
Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu
20 25 30

<210> 78 <211> 30 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Péptido 8 <400> 78

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
1 5 10 15
Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His
20 25 30

<210> 79 <211> 30 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Péptido 9 <400> 79

Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser
1 5 10 15
Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly
20 25 30

<210> 80
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Péptido 10

<400> 80

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
1 5 10 15
Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly
20 25 30

<210> 81
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 81

Cys Cys Gly Ala Ala Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Gly Cys Ala
1 5 10 15
Gly Gly Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Gly
20 25

ES 2 577 718 T3

<210> 82
< 211> 32
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220><
223> Cebador de PCR

<400> 82

Cys Cys Cys Thr Cys Gly Ala Gly Cys Cys Cys Cys Thr Cys Ala Ala
1 5 10 15
Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr
20 25 30

<210> 83
< 211> 31
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR <400> 83 agtaacggcc gccagtggtc tggaaatcgg a 31 <210> 84 <211> 32 <212>
PRT<213> Artificial <220> <223> Cebador de PCR <400> 84

Cys Cys Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly
1 5 10 15
Thr Thr Gly Gly Cys Cys Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Gly Cys Cys
20 25 30

< 210> 85 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial <220> <223> Cebador de PCR <400> 85 cgaagcttga tgaacaggaa
tggaaaggag accaag 36 <210> 86 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial <220> <223> Cebador de PCR <400>
86 tctctgagca cctgcagttg gccctcctc gcct 34 <210> 87 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial <220> <223>
Cebador de PCR <400> 87 gcaccatggc agccggaaca gcagttg 27 <210> 88 <211> 29 <212> DNA <213>
Artificial <220> <223> Cebador de PCR <400> 88 gagtctcgag gcagaatcta caatttctg 29

<210> 89
< 211> 90
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador de PCR

<400> 89

atgctacata tgaaaaagac agctatcgcg attgcagtg cactggctgg tttcgtacc 60
gtagcgagg ccgctcaaaa catcacagcc 90

ES 2 577 718 T3

<210> 90
< 211> 79
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador de PCR

<400> 90

```
atgctactcg agtcagtggt ggtggtggtg gtgagttccc agccctgatc ctcccacaga 60  
gcctgcagtt ggcccctcc 79
```

<210> 91
< 211> 42
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador de PCR

<400> 91
gtacgatatc gaggacgaa tggatccacc gtgcccagca cc 42

<210> 92
< 211> 32
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador de PCR

<400> 92
ctagtctaga tcatttacc ggagacaggg ag 32

<210> 93
< 211> 42
< 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador de PCR

<400> 93

ES 2 577 718 T3

gtacgatatc gagggacgaa tggatccacc gtgccagca cc 42

<210> 94

< 211> 32 <212> DNA <213> Artificial <220> <223> Cebador de PCR <400> 94 ctagtctaga tcattacc ggagacaggg
ag 32.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que comprende un dominio de fijación de antígeno, siendo dicho anticuerpo capaz de fijar un epítipo de una molécula RAGE humana, comprendiendo dicho dominio de fijación de antígeno una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), comprendiendo dicha región VH el conjunto CDR constituido por SEQ ID NO: 10, 11 y 12 en el que al menos una de dichas 3 CDRs es una secuencia de aminoácidos CDR modificada que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con la secuencia parental y comprendiendo dicha región VL el conjunto CDR constituido por SEQ ID NO: 14, 15 y 16, en donde al menos una de dichas 3 CDRs es una secuencia de aminoácidos CDR modificada que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con la secuencia parental, y en donde dicho anticuerpo se fija al dominio C-2 de RAGE y es capaz de inhibir la reducción del flujo sanguíneo cerebral inducida por el péptido soluble A β -40 *in vivo* en ratones hembra C57BL para 6.2.
2. El anticuerpo conforme a la reivindicación 1, en el cual el conjunto CDR comprendido por la región VH se compone de SEQ ID NO: 10, 11 y 12, y el conjunto CDR comprendido por la región VL se compone de SEQ ID NO: 14, 15 y 16.
3. El anticuerpo conforme a la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente un marco aceptor humano.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada seleccionado de SEQ ID NO: 56 y 57; y/o al menos un dominio variable de cadena ligera seleccionado de SEQ ID NO: 58 y 59.
5. El anticuerpo conforme a la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo comprende al menos una mutación de marco seleccionada de las mutaciones en:

posición de aminoácido 1, 2, 68, 70, 72, 76, 85, 89 ó 95 de la secuencia de cadena pesada; y
posición de aminoácido 11, 13, 43, 49, 58, 70 ó 87 de la secuencia de cadena ligera.
6. El anticuerpo de uno cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo comprende al menos un dominio variable mutado en el marco que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

las secuencias de cadena pesada conforme a SEQ ID NO: 62, 67, 68 y 69; y
las secuencias de cadena ligera conforme a SEQ ID NO: 63, 64, 65 y 66.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es el anticuerpo 11 E6, que comprende una región VH conforme a SEQ ID NO: 9 y una región VL conforme a SEQ ID NO: 13.
8. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado conforme a la reivindicación 8.

10. Una célula hospedadora que comprende un vector conforme a la reivindicación 9.
- 5 11. Un método de producción de un anticuerpo capaz de fijar RAGE, que comprende cultivar una célula hospedadora conforme a la reivindicación 10 en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de fijación capaz de fijar RAGE.
12. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 producido conforme al método de 11.
- 10 13. Una composición para la liberación de un anticuerpo, comprendiendo dicha composición
- (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 a 7 en forma cristalizada como un ingrediente; y
- (b) al menos un portador polímero.
- 15 14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 15. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento de un mamífero.
- 25 16. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 15 para tratamiento de enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo que comprende Esclerosis Lateral Amiotrófica, Lesión del Plexo Braquial, Lesión Cerebral, con inclusión de lesión cerebral traumática, Parálisis Cerebral, Ataxia de Friedrich, Guillain Barré, Leucodistrofias, Esclerosis Múltiple, Post Polio, Espina Bífida, Lesión de la Médula Espinal, Atrofia Muscular Espinal, Tumores Medulares, Ictus, Mielitis Transversa, Demencia, Demencia Senil, Deterioro Cognitivo Moderado, Demencia Relacionada con Alzheimer, Corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, Mal de Parkinson, síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia grave, trauma de nervios, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión agudo, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, nefropatía diabética, sepsis, artritis reumatoide y
- 30 enfermedades inflamatorias afines.
17. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 16 para tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

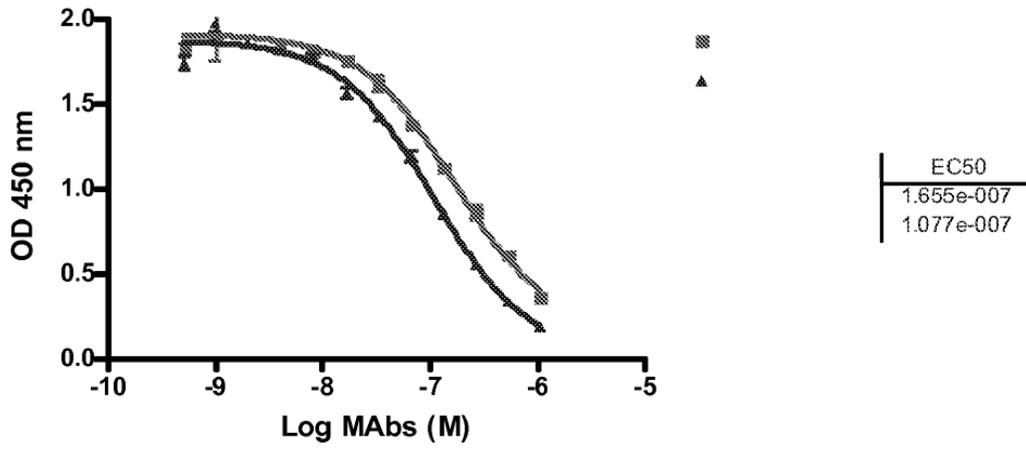


Fig. 1A

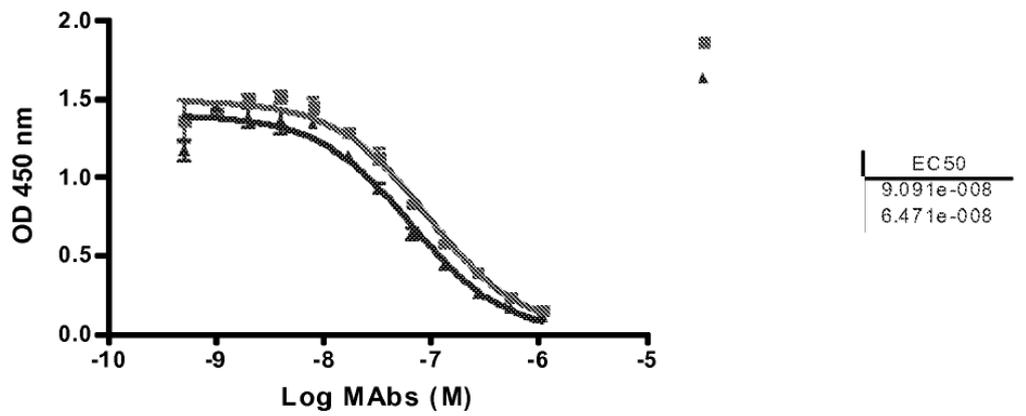


Fig. 1B

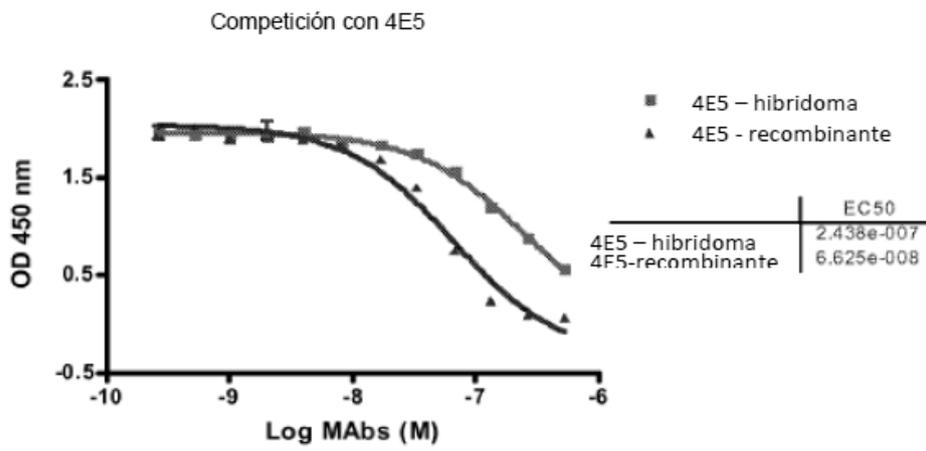


Fig. 1C

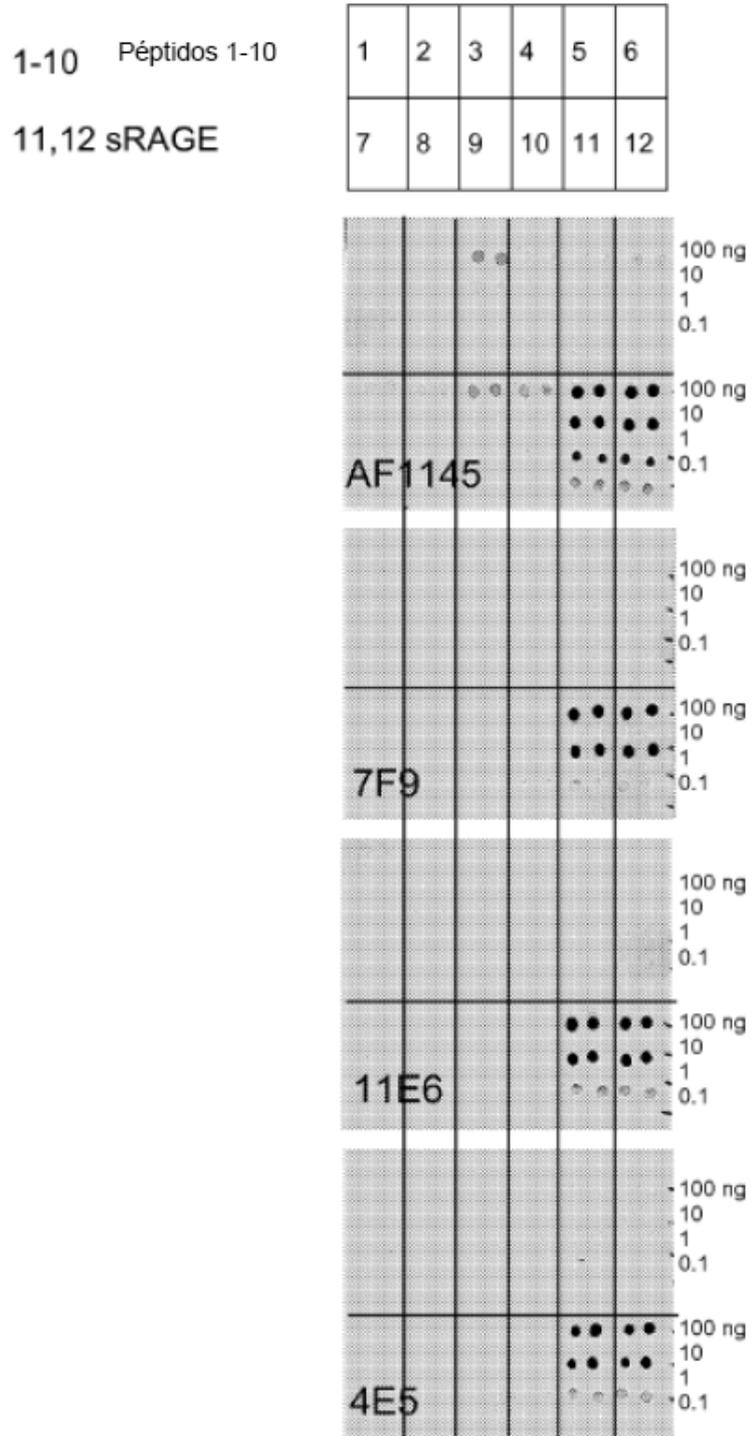


Fig. 2

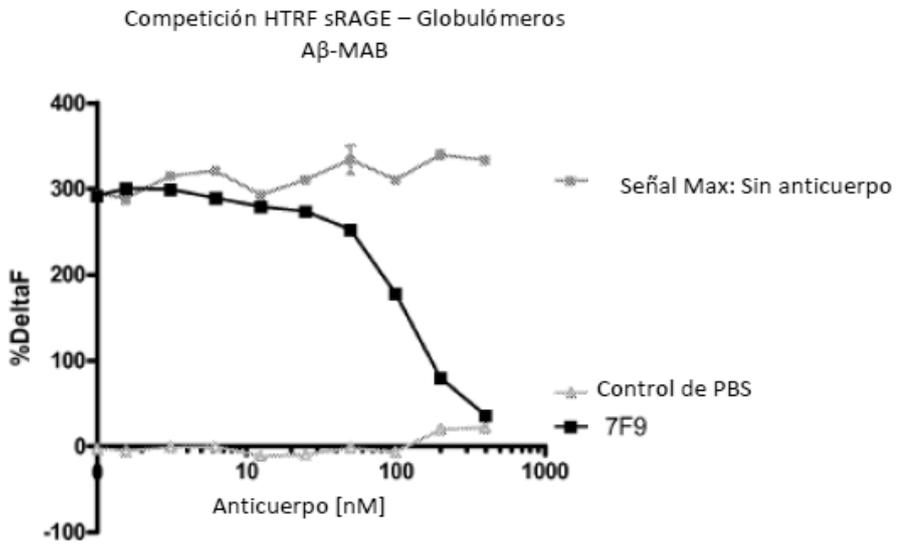


Fig. 3A

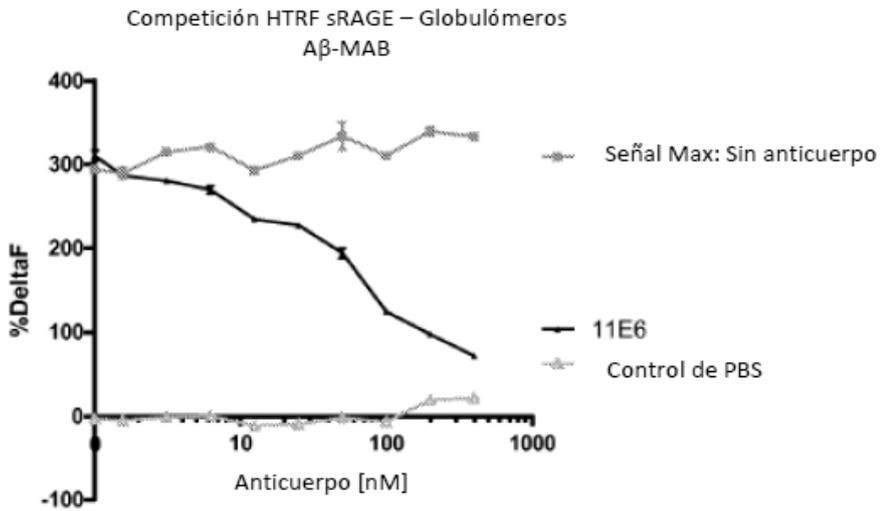


Fig. 3B

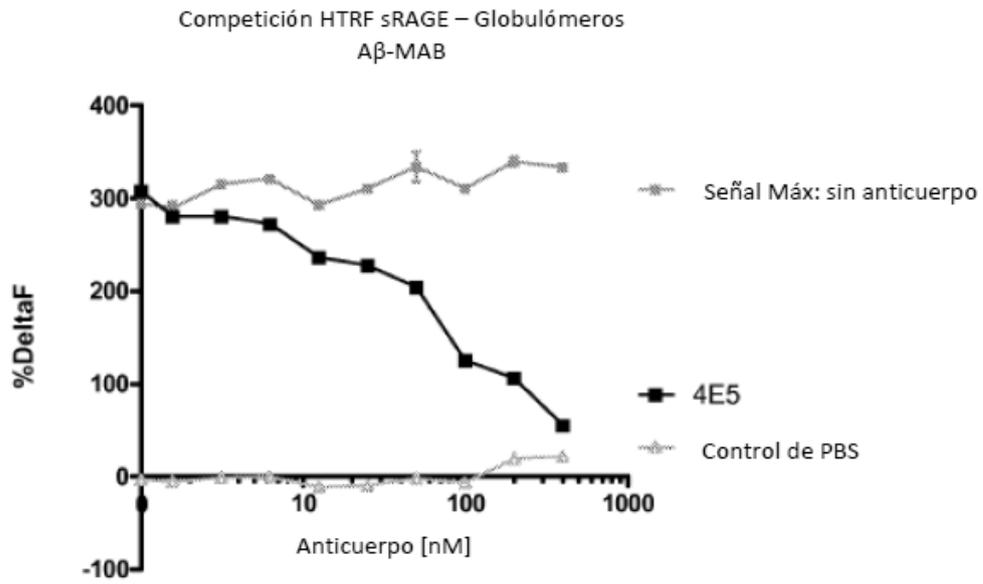


Fig. 3C

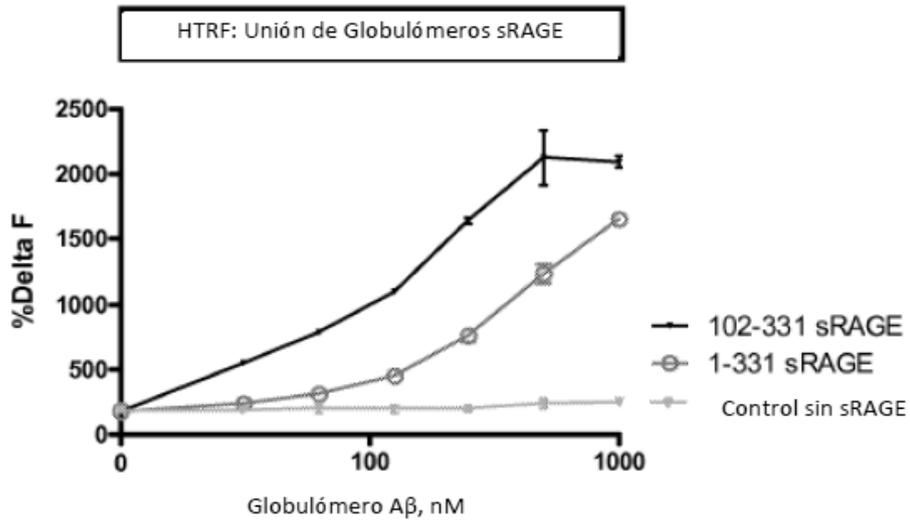


Fig. 4

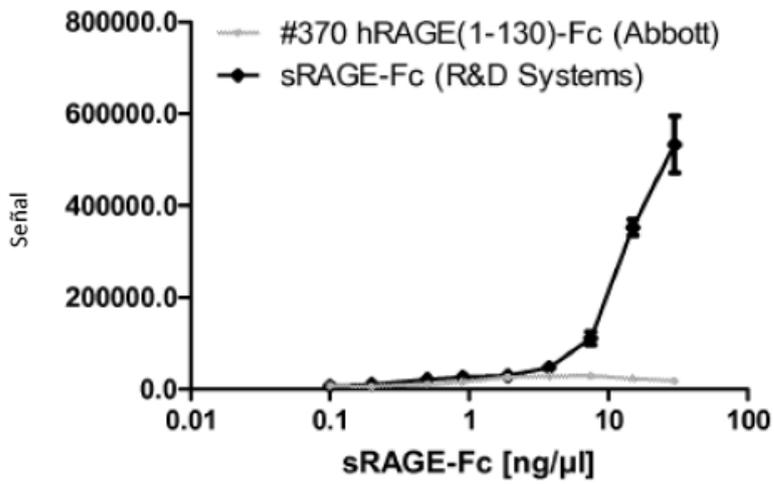


Fig. 5

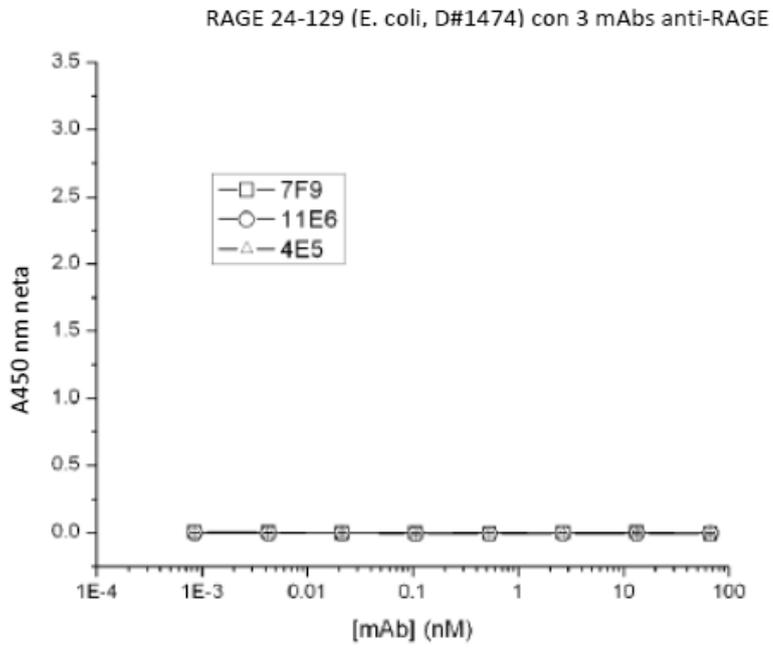


Fig. 6A

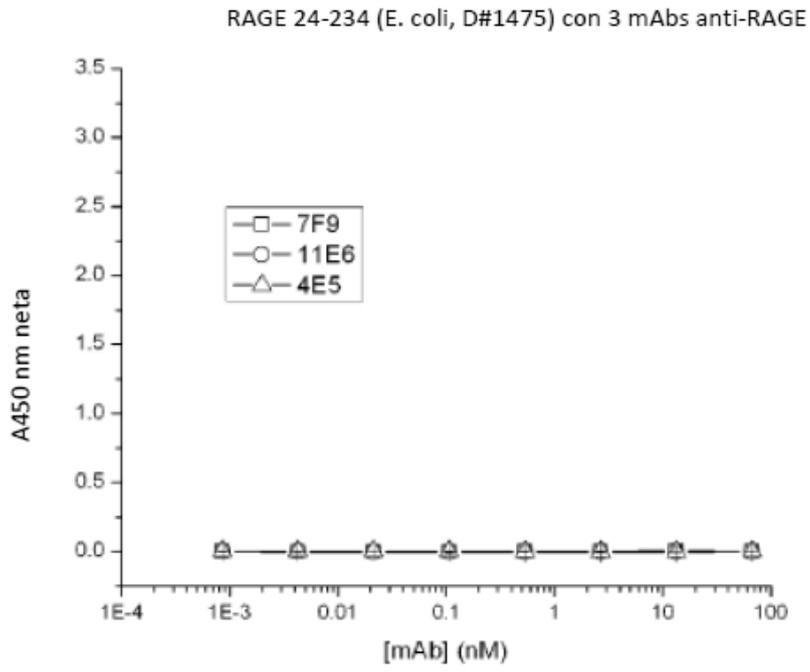


Fig. 6B

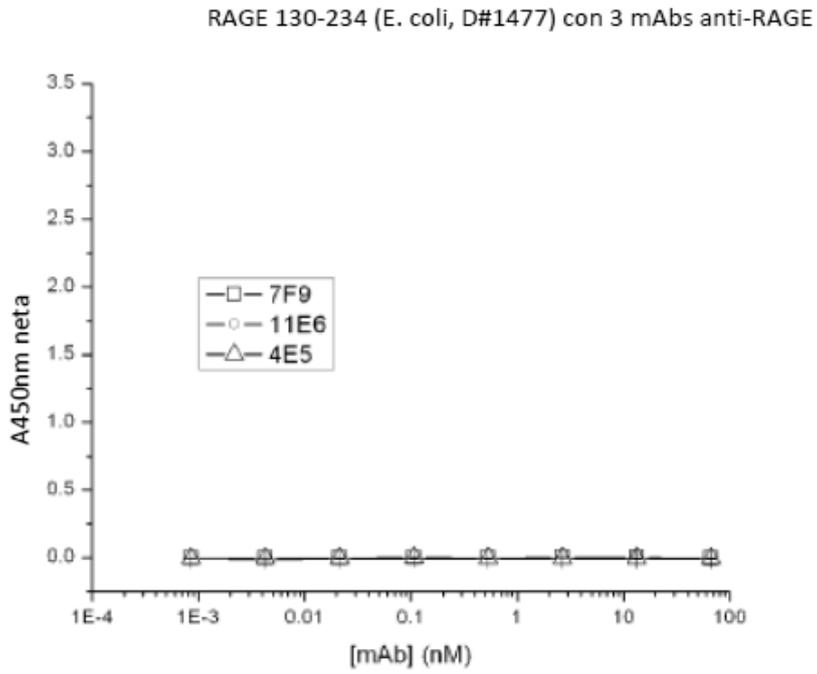


Fig. 6C

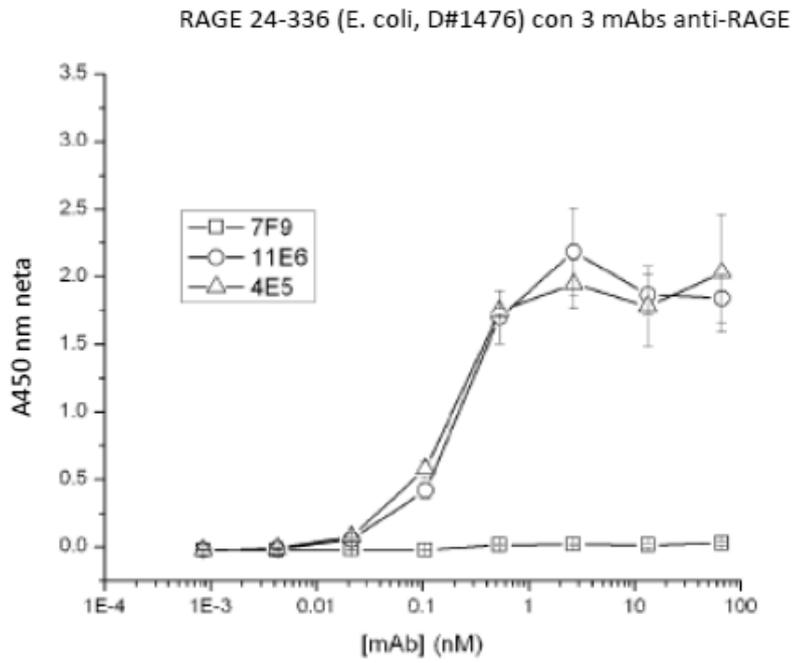


Fig. 7A

RAGE 130-336 (E. coli, D#1478) con 3 mAbs anti-RAGE

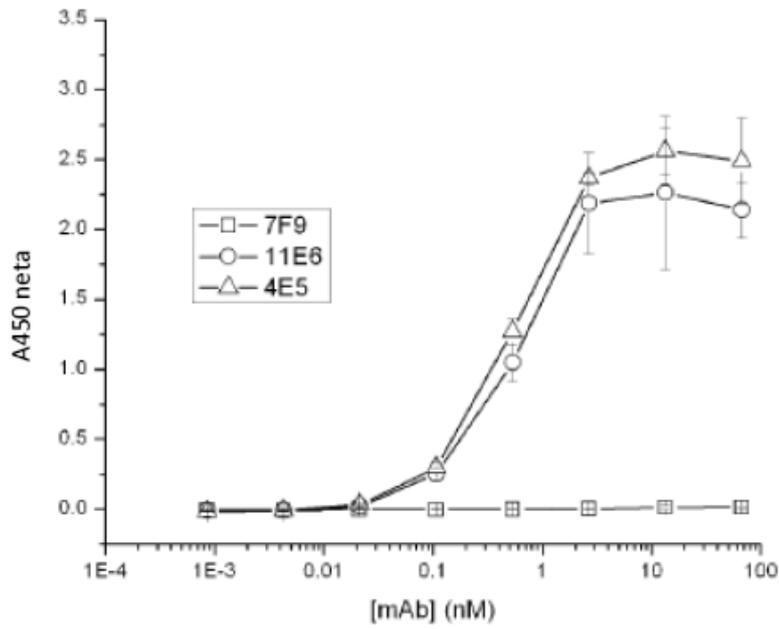


Fig. 7B

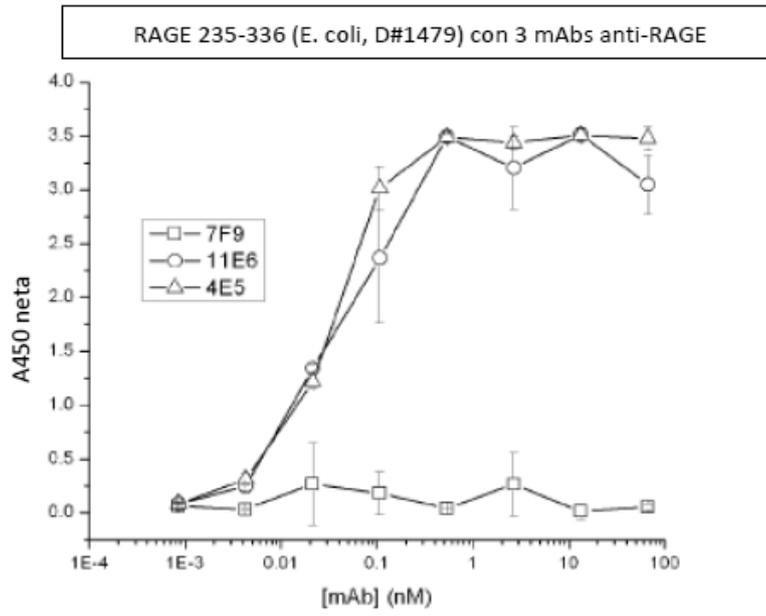


Fig. 7C

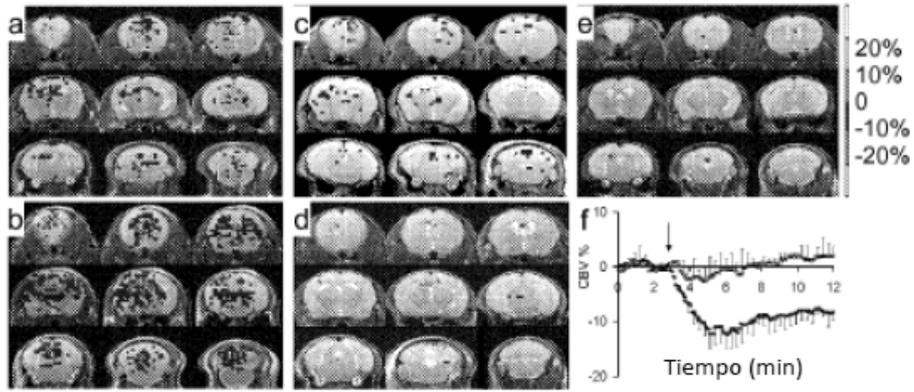


Fig. 8

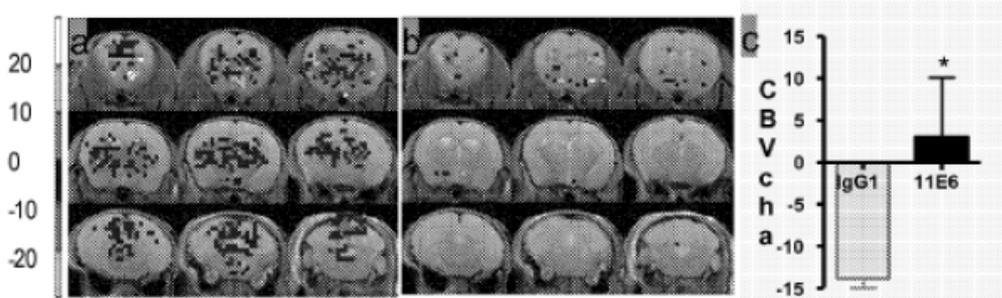


Fig. 9

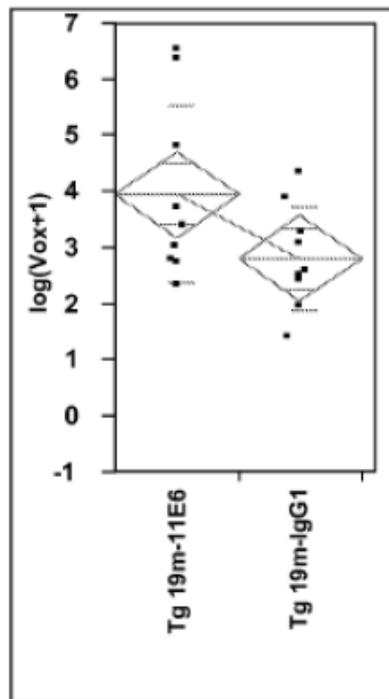
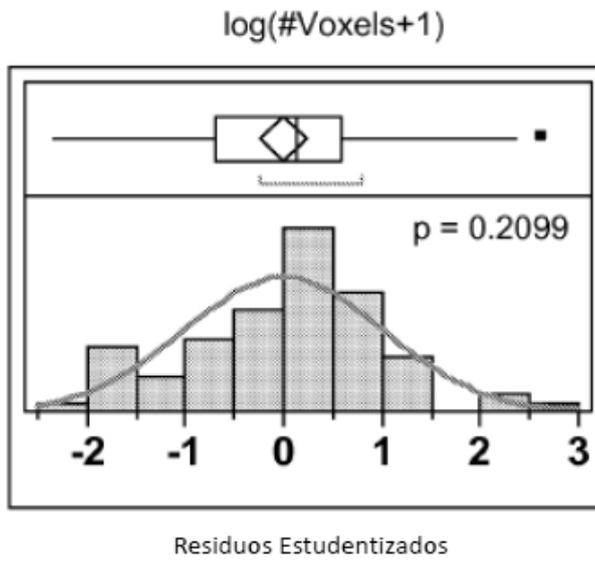
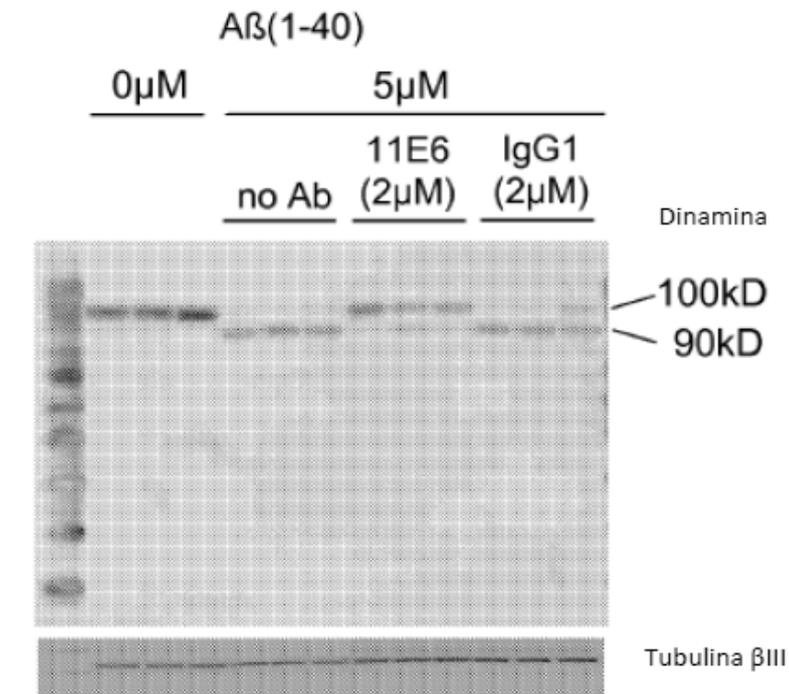


Fig. 10



Efecto del anticuerpo anti-RAGE 11E6

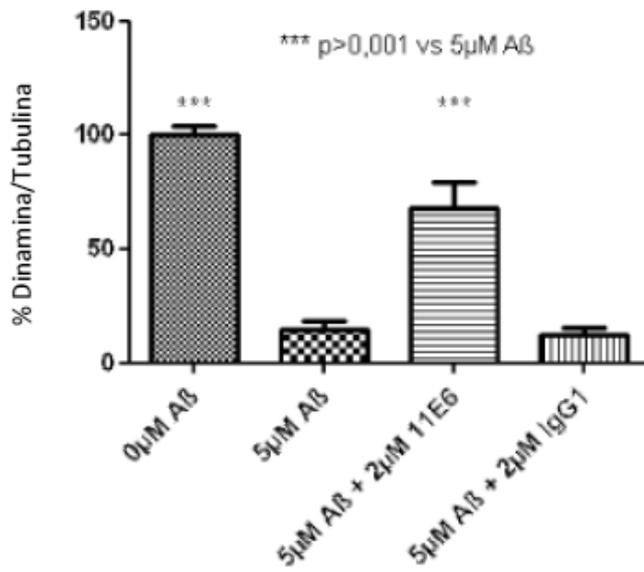


Fig. 11

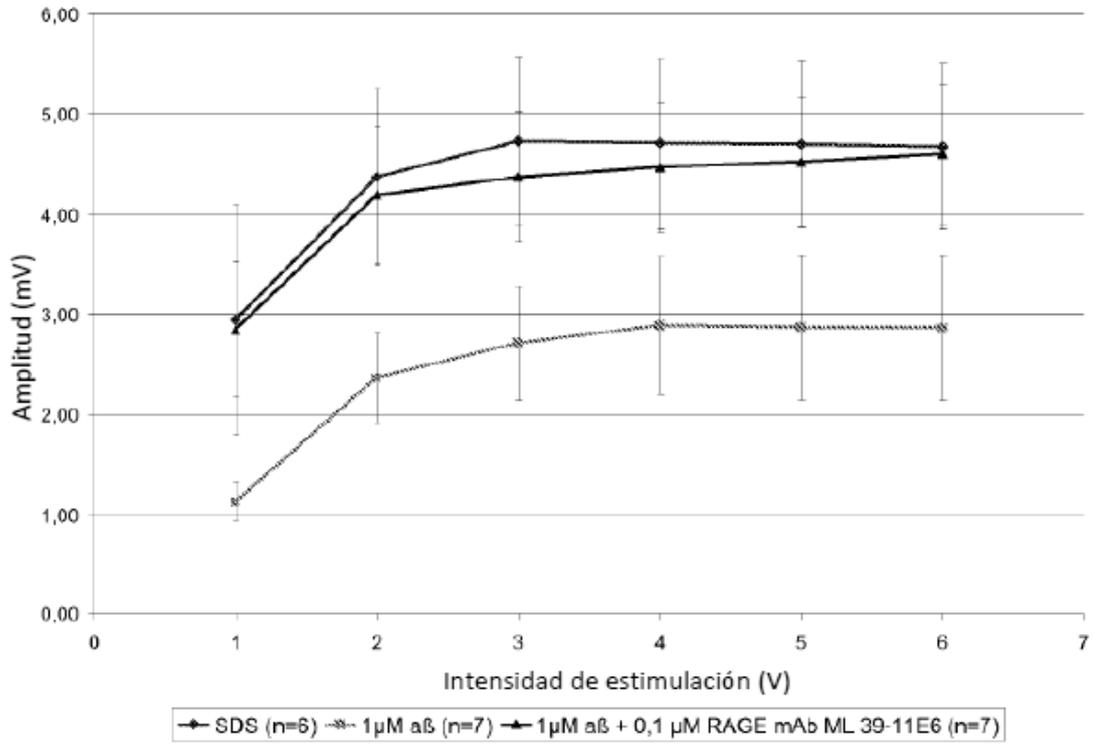


Fig. 12A

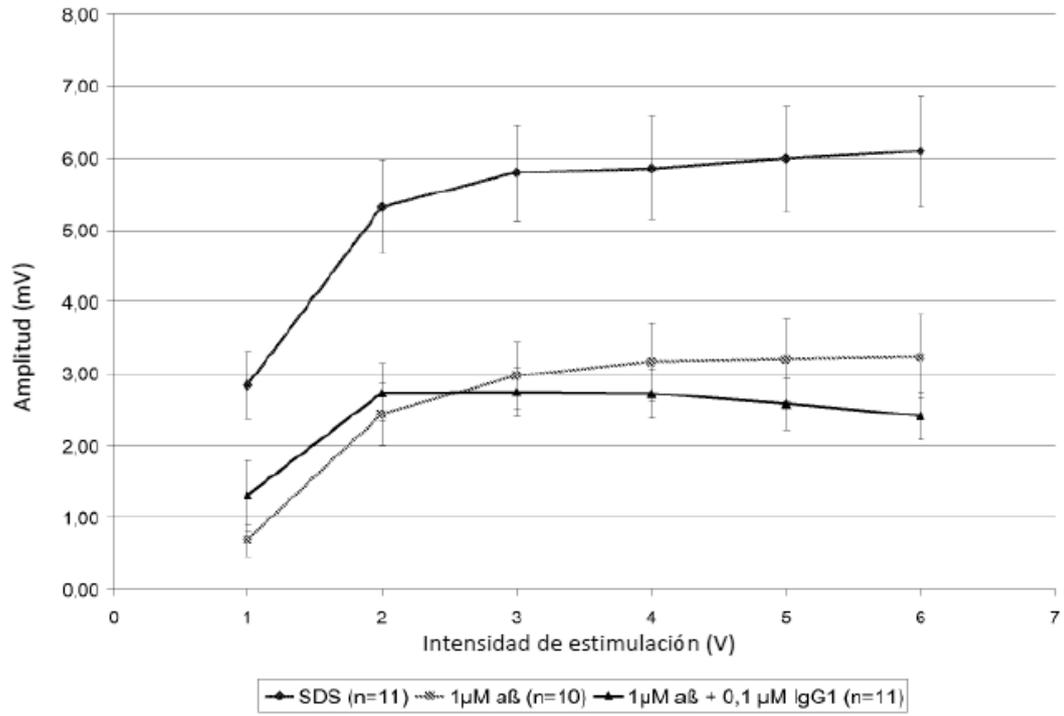


Fig. 12B

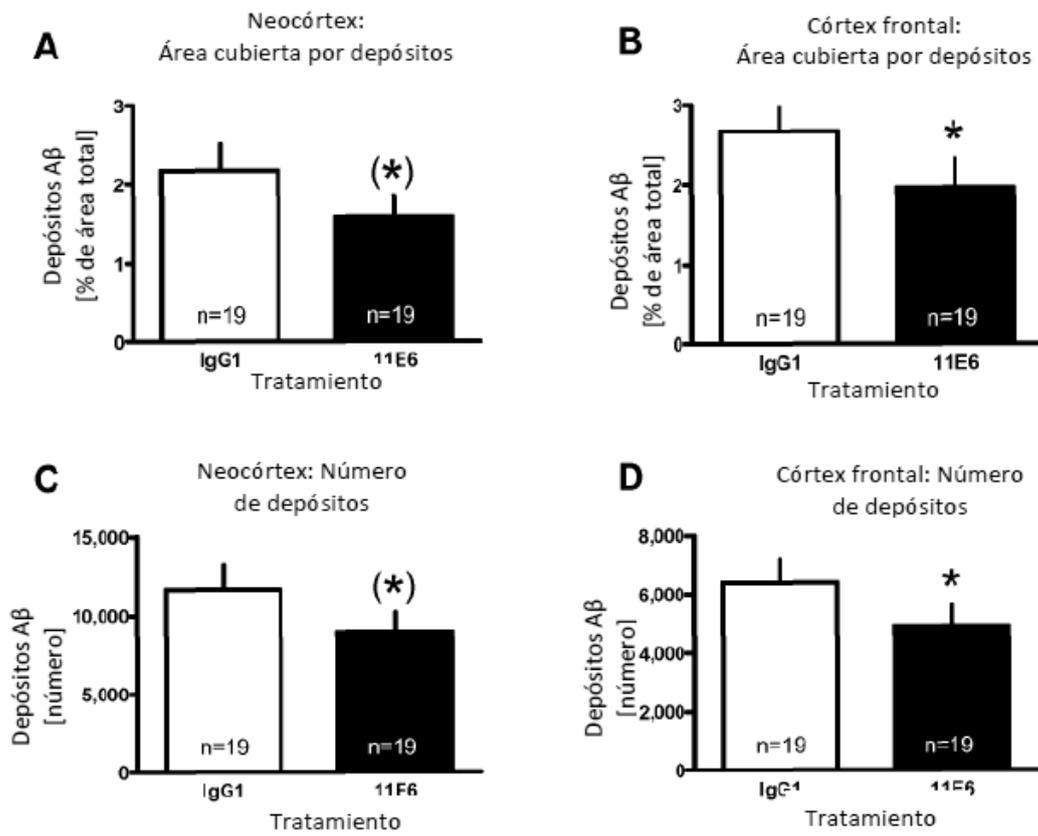


Fig. 13