

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 554**

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 12168663 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2500361**

54 Título: **Anticuerpos para el receptor de productos terminales de 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:

12.08.2016

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;

MUELLER, REINHOLD;

EBERT, ULRICH;

NIMMRICH, VOLKER;

HSIEH, CHUNG-MING;

WU, ZHEN;

DIGIAMMARINO, ENRICO L.;

LUO, FENG;

FOX, GERARD B.;

HARLAN, JOHN E.;

SCHMIDT, MARTIN y

LOEBBERT, RALF

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 579 554 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 para el receptor de productos terminales de glicación avanzada (RAGE) y usos de los mismos

CAMPO TÉCNICO

5 La presente solicitud se refiere a anticuerpos, particularmente a anticuerpos monoclonales y en particular a versiones humanizadas de los mismos con CDRs injertadas, que se pueden utilizar en el tratamiento y el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA), la degeneración de las células del sistema nervioso central, alteraciones del aprendizaje y la memoria, el transporte anormal de β amiloide y otros trastornos neuroinflamatorios asociados con el receptor de los productos finales de glicación avanzada (del inglés, "Receptor of Advanced Glycation End Products" RAGE). En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos y a fragmentos de los mismos que se unen a RAGE.

INFORMACIÓN GENERAL

15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia entre las personas de edad, con una incidencia de aproximadamente el 10% de la población en los mayores de 65 años de edad. Con la edad, la probabilidad de enfermedad también aumenta. A nivel mundial, hay cerca de 15 millones de personas afectadas con la enfermedad y se espera que aumentos adicionales de la esperanza de vida aumenten el número de personas afectadas por la enfermedad, hasta aproximadamente tres veces durante las próximas décadas. En vista de lo anterior, existe una necesidad enorme e inmediata de un tratamiento de la EA. Con un tratamiento de este tipo, los pacientes afectados pueden ser capaces de mantener un estilo de vida funcional y activo durante muchos años, más allá de lo que sería posible sin dicho tratamiento. Por lo tanto, no solo existen unas implicaciones económicas para dicho tratamiento, sino que hay implicaciones de la "calidad de vida" de los pacientes, así como de sus cuidadores.

25 Desde un punto de vista molecular, la EA se caracteriza por un depósito de proteínas, agregadas de forma anormal. En el caso de las placas amiloides extracelulares, estos depósitos consisten principalmente en filamentos de péptido β amiloide (A β) y en el caso de los ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs), la mayoría consiste en proteína tau. La EA se caracteriza también por un aumento de la expresión neuronal de RAGE. RAGE es un receptor multi-ligando de la familia de las inmunoglobulinas que actúa como un receptor de la superficie celular para la transducción de señales para A β .

30 Diversos grupos han mostrado que una infusión de A β 40 en ratones conduce a una vasoconstricción de los vasos cerebrales y a una disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC). Los pacientes que padecen de EA también tienen una disminución del flujo sanguíneo cerebral. En modelos de ratón con EA, en donde animales transgénicos hiperexpresan la proteína precursora de amiloide (APP) que conduce a una enfermedad que causa la formación de placas, se ha implicado a RAGE como un factor patógeno en la progresión de la enfermedad (Deane et al. Nature Medicine 9(7) págs. 907-913, 2003; Arancio et al. EMBOJ, 1-10, 2004).

35 Se ha observado que RAGE se une a péptidos A β . La inhibición de esta interacción elimina la acumulación de A β en el modelo de animal transgénico; por lo tanto, se cree que RAGE está implicado en la EA. El tratamiento con sRAGE (RAGE soluble), así como con anticuerpos anti-RAGE ha mostrado que disminuye el número de placas (Deane et al., 2003). El bloqueo de la interacción de RAGE con amiloide a través de anticuerpos podría convertirse en un tratamiento para los pacientes con EA; sin embargo, los anticuerpos policlonales existentes, generados a partir de suero animal no son adecuados para el tratamiento crónico de seres humanos.

40 La interacción de RAGE con A β , se describe en el documento WO 2006/077101 A1, que describe la competición de RAGE que carece del dominio v por la unión de A β a RAGE, así como la competición de péptidos que representan partes del dominio C-terminal de RAGE, sobre todo el dominio C1. La interacción de anticuerpos anti-RAGE con el dominio v de RAGE, se describe en el documento WO2007109749 (A2); que también describe que la unión de diferentes ligandos ((S100b, HMGB1 (proteína "High Mobility Group Box 1"), A β amiloide) se podría enlazar a RAGE a través de la unión a este dominio.

45 El documento WO 2008/137552 A2 describe ciertos anticuerpos monoclonales anti-RAGE que se unen a diferentes dominios de RAGE. La mayoría de dichos anticuerpos inhiben la interacción de RAGE humano y un complejo de HMGB1 y ADN CpG.

50 El documento WO 2006/077101 se refiere a la identificación, la funcionalidad y el uso de péptidos denominados AGER-RME y AGER-CDP de RAGE. Dichos péptidos son aplicables entre otras cosas, a la identificación y la preparación de ligandos que se unen a RAGE, tales como anticuerpos anti-RAGE.

La presente invención describe nuevos anticuerpos monoclonales que se unen a los dominios C de RAGE y la interacción específica y la competición por la unión de A β con anticuerpos monoclonales para el dominio C1 y C2 en RAGE.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona moléculas de unión, en particular anticuerpos, que se unen específicamente a RAGE; tal y como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

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

En el presente documento se describen anticuerpos anti-RAGE que se unen específicamente a RAGE y comprenden una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NOs.: 5, 13 y 21, o es un fragmento que se une a RAGE de un anticuerpo comprendido en dichas secuencias.

10 También se describen en el presente documento anticuerpos anti-RAGE que se unen específicamente a RAGE y que comprenden una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NOs.: 1, 9 y 17, o es un fragmento que se une a RAGE de un anticuerpo comprendido en dichas secuencias.

15 En particular, en este documento se describen varios anticuerpos monoclonales que son capaces de unirse al dominio C de RAGE y de bloquear la unión de A β -globulímeros. Más específicamente, la presente invención describe el anticuerpo monoclonal 11E6, que se une al dominio C-2 de RAGE, que no se une 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 el sistema vascular cerebral en ratones.

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

Los anticuerpos anti-RAGE de la invención incluyen un anticuerpo anti-RAGE o un fragmento que se une a RAGE, tal y como se ha descrito anteriormente, que se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDRs o humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, una proteína de fusión y un anticuerpo humano.

25 En diversas realizaciones, los anticuerpos de la invención son anticuerpos recombinantes o anticuerpos monoclonales. Anticuerpos neutralizantes determinados, descritos en este documento se denominan en este documento AcMo7F9, AcMo11E6 y AcMo4E5 y fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos y otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos funcionales con propiedades equivalentes a AcMo7F9, AcMo11E6 y AcMo4E5, tales como una alta afinidad de unión con RAGE, con cinéticas de disociación bajas y capacidad de neutralización elevada, se consideran parte de la presente invención. Sin embargo, los anticuerpos humanos de la presente solicitud pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por el polipéptido RAGE inmunogénico de la inmunoglobulina humana de la línea germinal o un fragmento del mismo, lo que se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de la unión se puede medir por ELISAs competitivos, RIAs, tecnología BIAcore o KinExA. La tasa de disociación también se puede medir mediante tecnología BIAcore o KinExA. La tasa de afinidad de la unión y de la disociación se mide por resonancia de plasmón de superficie usando, por ejemplo, BIAcore.

30 Uno de los anticuerpos monoclonales tal y como se describe en el presente documento, el anticuerpo AcMo7F9, 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 AcMo7F9 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: 5 y SEQ ID NOs. 6, 7 y 8, que son los residuos 24-34, 50-56, 89-97 de SEQ ID NO: 5, respectivamente.

45 El anticuerpo monoclonal de la presente invención, el anticuerpo AcMo11E6, 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: 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. El anticuerpo AcMo11E6 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 de SEQ ID NO: 13, respectivamente. El AcMo11E6 se une al dominio C-2 de RAGE, no se une 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 el sistema vascular cerebral de ratones.

50 Otro de los anticuerpos monoclonales tal y como se describe en el presente documento, el anticuerpo AcMo4E5, 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 AcMo4E5 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, 50-56, 89-97 de SEQ ID NO: 21, respectivamente.

5 También se entiende que los anticuerpos monoclonales aislados que interaccionan con RAGE de la presente solicitud pueden ser una proteína de unión glicosilada, en donde el anticuerpo o una porción del mismo que se une a un antígeno comprende uno o varios residuos de hidratos de carbono. La producción de proteína naciente *in vivo* se puede someter a un procesamiento adicional, conocido como modificación post-traducciona. En particular, se pueden añadir enzimáticamente residuos de azúcar (glicosilo), un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que son portadoras de cadenas laterales de oligosacáridos unidas covalentemente, se conocen como proteínas o glicoproteínas glicosiladas. 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 (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas) y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a estos factores, el patrón de glicosilación de las proteínas y la composición de los residuos de glicosilo pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se expresa la proteína en particular. Residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no están limitados a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico.

10 Los anticuerpos de la presente solicitud comprenden una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, ya 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 sencilla. Las sustituciones de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo, son conocidas en la técnica (Winter, et al., documentos de Patente de EE.UU. n° 5.648.260; 5.624.821). La porción Fc de un anticuerpo es mediadora en varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y semivida/tasa de aclaramiento de un anticuerpo y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para anticuerpos terapéuticos, pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, son mediadores en ADCC y CDC a través de la unión a FcγRs y complemento C1q, respectivamente. Los receptores de Fc neonatal (FcRn) son los componentes decisivos que determinan la semivida en circulación de los anticuerpos. En todavía otra realización, al menos un residuo de aminoácido se sustituye en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A-1C muestran la unión con ELISA de anticuerpos recombinantes y monoclonales anti-RAGE humano obtenidos a partir de hibridomas, 7F9, 11E6 y 4E5, a RAGE humano recombinante.

35 La Figura 2 muestra la caracterización de los anticuerpos monoclonales 7F9, 11E6 y 4E5 mediante la unión por transferencia de punto.

Las Figuras 3A - 3C muestran los resultados del ensayo HTRF que muestran la competición entre sRAGE - globulímeros Aβ - anticuerpos monoclonales.

La Figura 4 muestra la HTRF de la unión de sRAGE - globulímero Aβ.

40 La Figura 5 muestra la unión de globulímero Aβ a sRAGE-Fc y al dominio v de RAGE.

Las Figuras 6A - 6C muestran experimentos de unión con ELISA de anticuerpos monoclonales de la invención a diferentes fragmentos de RAGE.

Las Figuras 7A - 7C muestran experimentos de unión con ELISA de anticuerpos monoclonales de la invención a diferentes fragmentos de RAGE.

45 Las Figuras 8a - 8f muestran cambios del flujo sanguíneo cerebral, inducidos por diferentes dosis de Aβ1-40.

Las Figuras 9a - 9c muestran efectos de 11E6 en los cambios inducidos por Aβ1-40 del flujo sanguíneo cerebral.

Las Figuras 10 muestran los cambios del flujo sanguíneo cerebral observados en ratones Tg2576 envejecidos, tratados con diferentes dosis de 11E6 o de anticuerpo control.

50 La Figura 11 muestra que el anticuerpo 11E6 protege las neuronas del hipocampo frente a la escisión de dinamina inducida por Aβ. Panel superior: se muestran las muestras que representan condiciones experimentales repetidas de un experimento aislado y las concentraciones de tratamiento (en μM) se indican arriba. Las células sin adición de Aβ muestran señales de dinamina I (~100 kDa) casi intactas (1ª barra), que disminuyen y revierten a un producto de escisión de ~90 kDa en células tratadas con Aβ 5 μM (2ª barra). El tratamiento con el anticuerpo 11E6 (3ª barra) impide la escisión, mientras que un anticuerpo control IgG1 (4ª barra) no tiene un efecto protector pronunciado.

Panel inferior: la cuantificación de la señal de dinamina de tres experimentos independientes (expresada como % de dinamina +/- SEM después de una normalización a un tratamiento con A β 0 μ M) reveló un efecto protector, estadísticamente significativo de 11E6 (ANOVA de una vía, prueba de Kruskal Wallis seguida por prueba de Dunn; * indica $p < 0,05$)

- 5 La Figura 12 muestra la influencia de 11E6 (A) o del anticuerpo control (B) sobre la fuerte supresión inducida con globulómero de la transmisión sináptica en un cultivo de cortes de hipocampo de rata. 11E6 0,1 μ M revertía completamente los déficits inducidos con globulómero (véase (A)).

- 10 La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento durante 12 semanas con anticuerpo 11E6 sobre los depósitos de placa amiloide en ratones Tg2576. Se muestra el área cubierta con placas (A, B) y el número de placas (C, D) tal como se detectan marcando con el anticuerpo anti-A β 6G1 después de un tratamiento con anticuerpo 11E6 o IgG1 de control (n = 19/grupo). El tratamiento con 11E6 reducía el área cubierta de depósitos y el número de depósitos en el neocórtex en un 24,5% (A) y 26,8% (C), respectivamente. Un análisis estadístico reveló una fuerte tendencia (asteriscos entre paréntesis, $p < 0,06$; prueba U de Mann-Whitney). La reducción era estadísticamente significativa en la corteza frontal (asteriscos, $p < 0,05$; prueba U de Mann-Whitney) cuando el área de los depósitos se reducía en un 23,5% (B) y su cantidad en un 26,8% (D) después del tratamiento con 11E6.
- 15

LISTA DE SECUENCIAS

- SEQ ID NO: 1: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 7F9
- SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 7F9 CDR-H1
- SEQ ID NO: 3: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 7F9 CDR-H2
- 20 SEQ ID NO: 4: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 7F9 CDR-H3
- SEQ ID NO: 5: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 7F9
- SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 7F9 CDR-L1
- SEQ ID NO: 7: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 7F9 CDR-L2
- SEQ ID NO: 8: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 7F9 CDR-L3
- 25 SEQ ID NO: 9: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 11E6
- SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 11E6 CDR-H1
- SEQ ID NO: 11: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 11E6 CDR-H2
- SEQ ID NO: 12: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 11E6 CDR-H3
- SEQ ID NO: 13: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 11E6
- 30 SEQ ID NO: 14: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 11E6 CDR-L1
- SEQ ID NO: 15: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 11E6 CDR-L2
- SEQ ID NO: 16: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 11E6 CDR-L3
- SEQ ID NO: 17: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 4E5
- SEQ ID NO: 18: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 4E5 CDR-H1
- 35 SEQ ID NO: 19: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 4E5 CDR-H2
- SEQ ID NO: 20: secuencia de aminoácidos de AcMo VH 4E5 CDR-H3
- SEQ ID NO: 21: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 4E5
- SEQ ID NO: 22: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 4E5 CDR-L1
- SEQ ID NO: 23: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 4E5 CDR-L2
- 40 SEQ ID NO: 24: secuencia de aminoácidos de AcMo VL 4E5 CDR-L3
- SEQ ID NO: 25: secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada humana de Ig gamma 1
- SEQ ID NO: 26: secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera humana de Ig kappa

ES 2 579 554 T3

- SEQ ID NO: 27: Secuencia de nucleótidos del plásmido completo de la estructura artificial nº 1 (negrita) que codifica OmpA-[RAGE (23-340)]-6His
- SEQ ID NO: 28: Secuencia de nucleótidos del plásmido completo de la estructura artificial nº 2 (negrita) que codifica 6His-(Thr)-[RAGE (24-129)]
- 5 SEQ ID NO: 29: Secuencia de nucleótidos del plásmido completo de la estructura artificial nº 3 (negrita) que codifica 6His-(Thr)-[RAGE (24-234)]
- SEQ ID NO: 30: Secuencia de nucleótidos del plásmido completo de la estructura artificial nº 4 (negrita) que codifica 6His-(Thr)-[RAGE (24-336)]
- 10 SEQ ID NO: 31: Secuencia de nucleótidos del plásmido completo de la estructura artificial nº 5 (negrita) que codifica 6His-(Thr)-[RAGE (130-234)]
- SEQ ID NO: 32: Secuencia de nucleótidos del plásmido completo de la estructura artificial nº 6 (negrita) que codifica 6His-(Thr)-[RAGE (130-336)]
- SEQ ID NO: 33: Secuencia de nucleótidos del plásmido completo de la estructura artificial nº 7 (negrita) que codifica 6His-(Thr)-[RAGE (235-336)]
- 15 SEQ ID NO: 34: secuencia de aminoácidos codificada por la proteína nº 1 de RAGE
- SEQ ID NO: 35: secuencia de aminoácidos codificada por la proteína nº 2 de RAGE
- SEQ ID NO: 36: secuencia de aminoácidos codificada por la proteína nº 3 de RAGE
- SEQ ID NO: 37: secuencia de aminoácidos codificada por la proteína nº 4 de RAGE
- SEQ ID NO: 38: secuencia de aminoácidos codificada por la proteína nº 5 de RAGE
- 20 SEQ ID NO: 39: secuencia de aminoácidos codificada por la proteína nº 6 de RAGE
- SEQ ID NO: 40: secuencia de aminoácidos codificada por la proteína nº 7 de RAGE
- 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 de la región estructural VH7-4.1/JH6 FR1
- 25 SEQ ID NO: 44: secuencia de aminoácidos de la región estructural VH7-4.1/JH6 FR2 y VH1-2/JH6 FR2
- SEQ ID NO: 45: secuencia de aminoácidos de la región estructural VH7-4.1/JH6 FR3
- SEQ ID NO: 46: secuencia de aminoácidos de la región estructural VH7-4.1/JH6 FR4 y VH1-2/JH6 FR4
- SEQ ID NO: 47: secuencia de aminoácidos de la región estructural VH1-2/JH6 FR1
- SEQ ID NO: 48: secuencia de aminoácidos de la región estructural VH1-2/JH6 FR3
- 30 SEQ ID NO: 49: secuencia de aminoácidos de la región estructural 1-12/L5/JK2 FR1
- SEQ ID NO: 50: secuencia de aminoácidos de la región estructural 1-12/L5/JK2 FR2
- SEQ ID NO: 51: secuencia de aminoácidos de la región estructural 1-12/L5/JK2 FR3
- SEQ ID NO: 52: secuencia de aminoácidos de la región estructural 1-12/L5/JK2 FR4 y 3-15/L2/JK2 FR4
- SEQ ID NO: 53: secuencia de aminoácidos de la región estructural 3-15/L2/JK2 FR1
- 35 SEQ ID NO: 54: secuencia de aminoácidos de la región estructural 3-15/L2/JK2 FR2
- SEQ ID NO: 55: secuencia de aminoácidos de la región estructural 3-15/L2/JK2 FR3
- SEQ ID NO: 56: secuencia de aminoácidos con injerto de CDR VH 11E6.1-GL
- SEQ ID NO: 57: secuencia de aminoácidos con injerto de CDR VH 11E6.2-GL
- SEQ ID NO: 58: secuencia de aminoácidos con injerto de CDR VL 11E6.1-GL
- 40 SEQ ID NO: 59: secuencia de aminoácidos con injerto de CDR VL 11E6.2-GL

ES 2 579 554 T3

- 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 del anticuerpo humanizado VH h11E6.1
- SEQ ID NO: 63: secuencia del anticuerpo humanizado VL h11E6.1
- 5 SEQ ID NO: 64: secuencia del anticuerpo humanizado VL h11E6.2
- SEQ ID NO: 65: secuencia del anticuerpo humanizado VL h11E6.3
- SEQ ID NO: 66: secuencia del anticuerpo humanizado VL h11E6.4
- SEQ ID NO: 67: secuencia del anticuerpo humanizado VH h11E6.5
- SEQ ID NO: 68: secuencia del anticuerpo humanizado VH h11E6.9
- 10 SEQ ID NO: 69: secuencia del anticuerpo humanizado VH h11E6.16
- SEQ ID NO: 70: secuencia de aminoácidos del péptido NtermR31 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 71: secuencia de aminoácidos del péptido 1 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 72: secuencia de aminoácidos del péptido 2 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 73: secuencia de aminoácidos del péptido 3 obtenido a partir de RAGE
- 15 SEQ ID NO: 74: secuencia de aminoácidos del péptido 4 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 75: secuencia de aminoácidos del péptido 5 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 76: secuencia de aminoácidos del péptido 6 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 77: secuencia de aminoácidos del péptido 7 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 78: secuencia de aminoácidos del péptido 8 obtenido a partir de RAGE
- 20 SEQ ID NO: 79: secuencia de aminoácidos del péptido 9 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 80: secuencia de aminoácidos del péptido 10 obtenido a partir de RAGE
- SEQ ID NO: 81: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
- SEQ ID NO: 82: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
- SEQ ID NO: 83: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
- 25 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
- SEQ ID NO: 88: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
- 30 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
- SEQ ID NO: 93: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos
- 35 SEQ ID NO: 94: secuencia de nucleótidos de cebadores oligonucleotídicos

DESCRIPCIÓN DETALLADA**1. Definiciones generales**

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos normales en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben ser claros, sin embargo, en el caso de una ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en este documento tienen prioridad sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que sea requerido por el contexto, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso de la expresión "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En general, las nomenclaturas y las técnicas utilizadas que están relacionadas con el cultivo de tejidos y células, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y de ácidos nucleicos, descritas en este documento, son bien conocidas y se utilizan comúnmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo según las especificaciones del fabricante, tal y como se realiza generalmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas y los procedimientos y técnicas de laboratorio relacionados con la química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento, son bien conocidas y utilizadas normalmente en la técnica. Se emplean técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica y para el tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención pueda ser comprendida más fácilmente, se definen a continuación los términos seleccionados.

El término "polipéptido" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas naturales o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de obtención, no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado natural; está sustancialmente exento de otras proteínas de la misma especie; es expresado por una célula de una especie diferente; o no se produce en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina de forma natural, estará "aislado" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también se puede hacer que esté sustancialmente exenta de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la materia.

El término "recuperación" tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al proceso de hacer que una especie química tal como un polipéptido, esté sustancialmente exenta de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, por ejemplo, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la materia.

La expresión "receptor de productos terminales de glicación avanzada (RAGE)" designa un receptor multiligando de la familia de las inmunoglobulinas, que se une a un péptido A β soluble, S100b, y HMGB1 (también conocido como anfoterina) entre otros. RAGE media en los cambios celulares pertinentes de forma patofisiológica como respuesta a la unión a estos ligandos. Los animales transgénicos que hiperexpresan RAGE y APP humana, muestran anomalías tempranas en el aprendizaje espacial y la memoria, lo que indica que RAGE es un cofactor para la perturbación neuronal inducida por A β en patologías de tipo Alzheimer y lo que sugiere que RAGE es una posible diana terapéutica para mejorar una disfunción celular.

La estructura de RAGE no se ha esclarecido. Una homología con otras proteínas conduce a un modelo en el que RAGE tiene varios dominios. Estos dominios se denominan de forma análoga a las inmunoglobulinas: (i) dominio de tipo V en el extremo N-terminal: este dominio equivalente en las inmunoglobulinas se une a antígeno y representa la única región de unión dentro de estas proteínas. En RAGE, este dominio se une a algunos ligandos similares a S100 (Ostendorp et al. EMBOJ. 26, 3875, 2007; Leclerc et al. JBC 282, 31317, 2007). Un anticuerpo monoclonal que se une al dominio de tipo v en RAGE compite en la unión de diferentes ligandos S100b, HMGB1 y amiloide β (documento WO2007109749 (A2)) lo que implica que estos ligandos también se unirían a RAGE a través de este mismo dominio. (ii) Primer dominio de tipo C2: Dos dominios dentro de RAGE tienen homología con los dominios C2 de las inmunoglobulinas; uno de estos dominios se ha denominado C1 (nomenclatura usada también por Ostendorp

et al. BBRC 2006). Se han descrito diversos ligandos que se unen a este dominio, por ejemplo, S100A12 (también llamado ENRAGE o Calgranulina C), que se une con una afinidad de $K_d = 90 \text{ nM}$ (Hofmann et al. Cell 97, 889, 1999; Xie et al. JBC, 282, 4218, 2007). A β compite con S100A12 por este dominio, lo que sugiere que A β también se une al dominio C1. (iii) Segundo dominio de tipo C2: este dominio se denomina C2 (también utilizado por Ostendorp et al. BBRC 2006). El ligando de RAGE S100A6 se une al dominio C2 y un anticuerpo generado contra un péptido del dominio C2 ha mostrado que compite con S100A6 para esta unión; el anticuerpo conduce a una reducción de la transducción de señales en SH-SY5Y (Leclerc et al. JBC 282, 31317, 2007).

Un "dominio RAGE" se puede definir de acuerdo con diferentes definiciones proporcionadas en el estado de la técnica:

10 De acuerdo con Xie et al. 2007, J. Biol. Chem., vol. 282: 4218-4231, se aplica la siguiente definición de 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).

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

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

25 En vista del alto grado de identidad, en particular con respecto a la definición de los dominios V, C1 y C2 y salvo que se indique lo contrario, cada una de las definiciones se puede aplicar con el fin de definir las características de unión de las proteínas de unión de la presente invención.

Como se ha indicado anteriormente, RAGE es capaz de unirse a diferentes ligandos a través de diferentes dominios. Los resultados de experimentos de competición con otros ligandos parecen indicar que A β se une al dominio C1 (Hofmann et al. Cell 97, 889, 1999 o Xie et al. JBC, 282, 4218, 2007). Como ejemplos no limitativos de ligandos de RAGE, se pueden citar:

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

El término "RAGE" tal y como se emplea en el presente documento, se refiere en particular a RAGE humano, también denominado "hRAGE" o "huRAGE". A menos que se indique lo contrario, el término "RAGE" también incluye moléculas de RAGE aisladas u obtenidas a partir de otras especies, diferentes de la humana, como por ejemplo, roedores, como ratones o ratas; o moléculas de RAGE bovinas.

El término "sRAGE" se refiere a una forma soluble de RAGE, obtenida a partir del dominio extracelular de RAGE. Por ejemplo, una molécula de sRAGE se obtiene a partir de RAGE humano, también denominado huRAGE, comprende los residuos de aminoácidos 1 a 331 (véase SEQ ID NO: 61) de RAGE humano (véase SEQ ID NO: 60).

"Actividad biológica", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a todas las propiedades biológicas

inherentes de RAGE, tal como se definen en el presente documento.

Las expresiones "unión específica" o "que se une específicamente", tal y como se emplean en el presente documento, haciendo 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 determinada (por ejemplo, un "determinante antigénico" o un "epítipo" tal como se define más adelante) en las especies químicas; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico del epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento, mutante, variante o derivado funcional de la misma, que conserva las características de unión a un epítipo, esenciales de una molécula de Ig. Un formato de mutante, variante o derivado de anticuerpo de este tipo es conocido en la técnica. Realizaciones no limitantes del mismo se describen a continuación. Un anticuerpo se dice que es "capaz de unirse" a una molécula, si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para unir de este modo la molécula con el anticuerpo.

Un "anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza en la presente memoria, se entiende que se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, que comparten una secuencia de aminoácidos común de una cadena pesada y de una cadena ligera, en contraste con preparaciones de anticuerpos "policlonales" que contienen una mezcla de diferentes anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar por varias tecnologías novedosas, tales como presentación en fagos, bacterias, levaduras o ribosomas, así como métodos clásicos ejemplificados por anticuerpos obtenidos a partir de hibridomas (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado mediante tecnología de hibridomas, tal como la metodología convencional de hibridoma de Kohler y Milstein ((1975) *Nature* 256: 495-497).

En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxi-terminal con el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

La expresión "porción que se une a antígeno" o "fragmento que se une a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a uno o a varios fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., RAGE). Se ha observado que la función de unirse al antígeno de un anticuerpo se puede realizar con fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales realizaciones de anticuerpo también pueden tener formatos biespecíficos, específicos duales o multispecíficos; uniéndose específicamente a dos o más antígenos diferentes. Ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., documento de publicación PCT WO 90/05144 A1), que comprende un dominio variable sencillo; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, se pueden unir, usando métodos recombinantes, a través de un enlazador sintético que les permite estar contruidos como una cadena proteica sencilla en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase p. ej., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también se entiende que están incluidos dentro de la expresión "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos, también se incluyen. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos, bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan sobre una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno (véase, p. ej., Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Porciones que se unen a anticuerpo de este tipo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel compiladores, *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. 790 págs. (ISBN 3-540-41354-5).

La expresión "estructura artificial de anticuerpo" tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a un polipéptido que comprende una o varias porciones que se unen a antígeno de la invención, unidas a un polipéptido enlazador o a un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazadores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para enlazar una o varias porciones que se unen a antígeno. Tales polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada y de cadena ligera de IgG humana se conocen en la técnica y se representan en la Tabla 1.

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

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
Región constante Ig gamma-1	SEQ ID NO.:25	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Mutante de región constante Ig gamma-1	SEQ ID NO.:41	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante Ig gamma-2	SEQ ID NO.:42	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNHDHAPS NTKVDKTVKRCCKVECPAPPVAGPSVF LFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTR VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante Ig Kappa	SEQ ID NO.:26	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSYISLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

Además, un anticuerpo o una porción que se une a antígeno del mismo puede formar parte de una molécula de inmunoadhesión de mayor tamaño, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o de la porción de anticuerpo con una o varias de otras proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para preparar una molécula tetramérica scFv (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas

15

(Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Las porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, las porciones de anticuerpo y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas convencionales de ADN recombinante, tal y como se describen en el presente documento.

Un "anticuerpo aislado", tal y como se emplea en el presente documento, se entiende que se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a RAGE humano, está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos que no sean RAGE humano). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a RAGE humano puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de RAGE de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o de productos químicos.

La expresión "anticuerpo humano", tal y como se emplea en este documento, se entiende que incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y en particular, CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal y como se emplea en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDRs obtenidas a partir de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, han sido injertadas en secuencias estructurales humanas.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal y como se emplea en el presente documento, se entiende que incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados empleando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (se describe más adelante), anticuerpos aislados a partir de una genoteca 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 Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, 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 implica el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque obtenidas a partir de, y relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera de una especie y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera de murino, ligadas a regiones constantes humanas. El anticuerpo quimérico se puede producir a través de técnicas de biología molecular recombinante, o se puede conjugar físicamente.

La expresión "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie, pero en donde las secuencias de una o varias de las regiones CDRs de VH y/o VL se sustituyen por secuencias de CDRs de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera de murino en donde una o más de las CDRs murinas (p. ej., CDR3) se ha sustituido por secuencias CDRs humanas.

Las expresiones "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcador de Kabat" se usan indistintamente en el presente documento. Estas expresiones, que están reconocidas en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción del mismo que se une a antígeno (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y Kabat, E.A., et al. (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publication NIH n° 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende desde las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable se extiende desde las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Tal y como se emplea en el presente documento, los términos y expresiones "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se

refieren al anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporciona o que codifica al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o varias de las regiones estructurales. En algunas realizaciones, el término "acceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o que 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 varias de las regiones estructurales y la o las regiones constantes. En una realización específica, el término "acceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de anticuerpo humano que proporciona o que codifica al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, en particular, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o varias de las regiones estructurales. De acuerdo con esta realización, un acceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 residuos de aminoácidos que no aparecen en una o varias posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región estructural aceptora y/o región o regiones constantes aceptoras se pueden derivar u obtener, por ejemplo, a partir de un gen de anticuerpo de la línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo o anticuerpos disponibles comercialmente).

Tal como se utiliza en este documento, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpos. Existen tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. La expresión "conjunto de CDRs" tal y como se emplea en este documento, se refiere a un grupo de tres CDRs que aparecen en una sola región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs se han definido de manera diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco, aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDRs. Estas CDRs se pueden referir como las 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 subporciones dentro de las CDRs de Kabat adoptan conformaciones casi idénticas de la cadena principal peptídica, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estos subporciones se denominaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, en donde la "L" y la "H" designan las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones se pueden referir como las CDRs de Chothia, que 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)). Otras definiciones adicionales de los límites de CDRs pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero no obstante se solapan con las CDRs de Kabat, a pesar de que se pueden acortar o prolongar, en vista de una predicción o de hallazgos experimentales, de que residuos concretos o grupos de residuos o incluso CDRs enteras no afectan significativamente a la unión al antígeno. Los métodos utilizados en el presente documento pueden utilizar CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque realizaciones determinadas utilizan CDRs definidas por Kabat o Chothia.

Tal y como se utiliza en este documento, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o una región estructural que define una estructura de CDR canónica determinada, tal como se define por Chothia et al. (*J. Mol. Biol.* 196:901-907 (1987); Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227:799 (1992)). De acuerdo con Chothia et al., porciones decisivas de las CDRs de muchos anticuerpos tienen conformaciones de la cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de la gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica específica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de la cadena principal del péptido para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forma un bucle.

Tal y como se emplea en el presente documento, el término "donante" y la expresión "anticuerpo donante" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDRs. En una realización particular, el anticuerpo donante es un anticuerpo procedente de una especie diferente a la del anticuerpo a partir del cual se obtienen o derivan las regiones estructurales. En el contexto de un anticuerpo humanizado, la expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o varias CDRs.

Tal y como se emplea en el presente documento, las expresiones "región estructural" o "secuencia estructural" se refieren a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Debido a que la definición exacta de una secuencia CDR se puede determinar por diferentes sistemas, el significado de una secuencia estructural está sujeto correspondientemente a diferentes interpretaciones. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2 y -L3 de la cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones estructurales en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en donde CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones determinadas como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región estructural, como se indica por otros, representa las FRs combinadas dentro de la región variable de una cadena sencilla de inmunoglobulina, de origen natural. Tal y como se emplea en este documento, una FR representa una de las cuatro subregiones y FRs representa dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región estructural.

Las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humana se conocen en la técnica. En una realización de la invención, las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humana se

seleccionan a partir de las secuencias descritas en la Tabla 2 y la Tabla 3. Las diferentes combinaciones de las secuencias estructurales humanas FR1 a FR4 están indicadas en dichas tablas.

Tabla 2: Secuencias aceptoras de cadena pesada humana

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
43	VH7-4.1/JH6 FR1	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT
44	VH7-4.1/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
45	VH7-4.1/JH6 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR
46	VH7-4.1/JH6 FR4	WGQGT TTVTVSS
47	VH1-2/JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT
44	VH1-2/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
48	VH1-2/JH6 FR3	RVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAR
46	VH1-2/JH6 FR4	WGQGT TTVTVSS

Tabla 3: Secuencias aceptoras de cadena ligera humana

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
49	L1-12/L5/JK2 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITC
50	L1-12/L5/JK2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
51	L1-12/L5/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLQPEDFATYYC
52	L1-12/L5/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
53	L3-15/L2/JK2 FR1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC
54	L3-15/L2/JK2 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
55	L3-15/L2/JK2 FR3	GIPARFSGSGSGTDFLT ISSLQSEDFAVYYC
52	L3-15/L2/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

5 Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento génico" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que conduce a la reorganización genética y mutación para la expresión de una inmunoglobulina determinada. (Véase, por ejemplo, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la presente invención parte del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal son más propensos que los genes de anticuerpos maduros a conservar estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales, características de individuos en la especie, por lo tanto, es menos probable que sea reconocido como procedente de una fuente ajena, cuando se usa terapéuticamente en esa especie.

15 Tal y como se utiliza en este documento, el término residuo "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen un mayor impacto sobre la especificidad de la unión y/o la afinidad de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no se limita a, uno o varios de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser cualquier 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 la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, un residuo dentro de la zona Vernier y un residuo de la región que se solapa entre la definición de Chothia de una CDR1 de cadena pesada variable y la definición de Kabat de la primera región estructural de la cadena pesada.

25 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere en general a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en donde al menos una porción de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más "similar a la humana", es decir, más similar a secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDRs, en el que se introducen secuencias de CDRs humanas en secuencias de VH y VL no humanas para

reemplazar las correspondientes secuencias CDRs no humanas.

En particular, la expresión "anticuerpo humanizado", tal y como se emplea en este documento, es un anticuerpo o una variante, un derivado, un análogo o un fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región estructural (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. Tal y como se utiliza en este documento, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR, se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, particularmente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica 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 donde todas o sustancialmente todas las regiones CDRs se corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, un anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. En particular, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera, como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o de una cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado se puede seleccionar a partir de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo 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 procedentes de más de una clase o isotipo y dominios constantes particulares se pueden seleccionar para optimizar funciones efectoras deseadas, usando técnicas bien conocidas en la materia.

Las regiones estructurales y CDRs de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponderse exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o la región estructural de consenso se pueden mutagenizar por sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido, de modo que el residuo de CDR o estructural en ese sitio no se corresponde ni con el anticuerpo donante ni con la región estructural de consenso. En una realización particular, sin embargo, tales mutaciones no serán extensas. Por lo general, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, particularmente al menos 85%, más particularmente al menos 90% y en particular al menos 95% de los residuos de anticuerpo humanizado se corresponden con los de las secuencias parentales FR y CDR. Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "región estructural de consenso" se refiere a la región estructural en la secuencia de inmunoglobulina de consenso. Tal y como se emplea en esta memoria, la expresión "secuencia de inmunoglobulina de consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos que aparecen con más frecuencia (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulinas relacionadas (véase, por ejemplo, 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 con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, se pueden incluir ambos en la secuencia de consenso.

Tal y como se emplea en este documento, zona "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos estructurales que puede ajustar la estructura de CDR y afinar el ajuste con el antígeno tal y como describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499). Los residuos de la zona Vernier forman una capa subyacente de las CDRs y pueden tener un impacto sobre la estructura de las CDRs y la afinidad del anticuerpo.

La expresión "inhibición de la unión" de RAGE a uno de sus ligandos, tal y como se emplea en el presente documento, incluye una reducción parcial (como por ejemplo, de aproximadamente 1 a 10% o superior, en particular de aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95%, o superior) o completa de dicha actividad de unión del ligando. Dicha "inhibición de la unión" se puede determinar por cualquier método adecuado disponible en la técnica, preferiblemente por cualquier método tal y como se ejemplifica en el presente documento, como por ejemplo los ensayos HTRF descritos en este documento.

Tal y como se emplea en este documento, el término "neutralizante" se refiere a la neutralización de una actividad biológica de una proteína diana, cuando una proteína de unión se une específicamente a la proteína diana. La neutralización puede ser el resultado de diferentes formas de unión de dicha proteína de unión a la diana. Por ejemplo, la neutralización puede estar causada por la unión de la proteína de unión a una región de la diana, que no afecta a la unión del receptor con la molécula diana. Alternativamente, la unión de una proteína de unión puede dar lugar a un bloqueo de la unión del receptor con la diana, en donde el bloqueo neutraliza finalmente la actividad de la proteína diana. Cada uno de dichos mecanismos diferentes se puede producir de acuerdo con la invención.

En particular, una proteína de unión neutralizante es un anticuerpo neutralizante cuya unión a RAGE da como resultado la neutralización de una actividad biológica de RAGE. En particular, la proteína de unión neutralizante se une a RAGE y reduce una actividad biológica de RAGE en al menos aproximadamente un 1 a un 10%, al menos

- aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o más. La neutralización de una actividad biológica de RAGE a través de una proteína de unión neutralizante se puede evaluar midiendo uno o varios indicadores de la actividad biológica de RAGE, bien conocidos en la técnica y/o ejemplificados 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 unión de RAGE a globulómeros A β , según lo medido en los Ejemplos 5 y 6 a continuación.
- Una "inhibición de la reducción del volumen sanguíneo cerebral inducida por el péptido A β 1-40 soluble" determinada *in vivo* en un modelo animal, se refiere a una inhibición parcial o completa, como por ejemplo de al menos aproximadamente 1 a 10%, de 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 negativo con isotipo de inmunoglobulina monoclonal o policlonal.
- Una "mejora del volumen sanguíneo cerebral" como en un modelo animal *in vivo* que hiperexpresa APP humana, se refiere a una mejora estadísticamente significativa del VSC, si se compara con un control no tratado, o en particular, si se compara con un control negativo con isotipo de inmunoglobulina monoclonal o policlonal.
- Una "reducción del número de placas amiloides y/o del área de placas amiloides" tal como se mide *in vivo* en un modelo animal que hiperexpresa APP humana, se refiere a una reducción parcial o completa, como por ejemplo de al menos aproximadamente un 1 a un 10%, al menos aproximadamente del 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 negativo con isotipo de inmunoglobulina monoclonal o policlonal.
- Una "inhibición de una escisión de dinamina inducida con el péptido A β 1-40 agregado de las neuronas del hipocampo *in vitro*" se refiere a una inhibición parcial o completa, como por ejemplo de al menos aproximadamente un 1 a un 10%, al menos aproximadamente del 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 negativo con isotipo de inmunoglobulina monoclonal o policlonal.
- Una "reversión de la reducción inducida por el globulómero A β 1-42 de la transmisión sináptica" *in vitro*, se refiere a una reversión parcial o completa, como por ejemplo de al menos aproximadamente un 1 a un 10%, al menos aproximadamente del 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 negativo con isotipo de inmunoglobulina monoclonal o policlonal.
- Un "anticuerpo monoclonal neutralizante" tal como se utiliza en la presente memoria se entiende que se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, que después de la unión con el antígeno específico son capaces de competir y de inhibir la unión del ligando natural con dicho antígeno. En una realización particular de la presente solicitud, los anticuerpos neutralizantes de la presente invención son capaces de competir con RAGE para unirse al menos a uno de sus ligandos, en particular, un ligando seleccionado a partir de péptidos A β , globulómeros A β , S100b y anfoterina, y para evitar la actividad o la función biológica de RAGE.
- El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de la unión de un anticuerpo hacia un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-RAGE que se une a un antígeno de RAGE y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-RAGE cuya unión a RAGE neutraliza la actividad biológica de RAGE.
- La "función biológica" o la "actividad" de RAGE se puede describir como la de un receptor de la superficie celular que transduce señales para A β o un receptor que media en el transporte de proteínas dentro de la célula o a través de la misma.
- El término "epítipo" o la expresión "determinante antigénico" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de linfocitos T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítipos incluyen agrupaciones superficiales, químicamente activas de moléculas 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 a la que se une un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno, cuando reconoce preferencialmente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.
- La expresión "resonancia de plasmón superficial", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para una descripción más detallada, véase Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.
- El término " k_{on} ", tal y como se emplea en el presente documento, se entiende que se refiere a la tasa constante de asociación de un anticuerpo con el antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno, tal como se conoce en la técnica.

El término " k_{off} ", tal y como se emplea en el presente documento, se entiende que se refiere a la tasa constante de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno tal como se conoce en la técnica.

El término " K_d ", tal y como se emplea en el presente documento, se entiende que se refiere a la constante de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno como se conoce en la técnica.

- 5 La expresión "proteína de unión marcada", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a una proteína con un marcador incorporado que proporciona la identificación de la proteína de unión. En particular, el marcador es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación en un polipéptido de restos biotínico que se pueden detectar con avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o colorimétricos).
- 10 Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotinilados; epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de parejas de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítopos); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

- La expresión "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unida químicamente a un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a base de materiales biológicos. Particularmente, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a la toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

- 25 Los términos "cristal" y "cristalizado" tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a un anticuerpo, o a una porción que se une a antígeno del mismo, que existe en forma de cristal. Los cristales son una forma de 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 matrices regulares, repetitivas, tridimensionales de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se conocen bien en la técnica. La unidad fundamental, o elemento base, que se repite en un cristal se denomina la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica dada bien definida, proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria mediante traslados 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., págs. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

El término "polinucleótido" tal y como se refiere en el presente documento significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN, pero en particular es ADN bicatenario.

- 40 La expresión "polinucleótido aislado" tal y como se emplea en este documento, significa un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, ADNc o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no está asociado con todo el polinucleótido o con una porción del mismo con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está ligado funcionalmente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza; o no tiene lugar en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

- 45 El término "vector", tal y como se emplea en el presente documento, se entiende que se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión que son útiles en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden emplear indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector que se utiliza más comúnmente. Sin embargo, la invención se entiende que incluye otras formas de este tipo de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

La expresión "ligado funcionalmente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite actuar de la forma prevista. Una secuencia de control "ligada funcionalmente" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "ligadas funcionalmente" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son adyacentes 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. La expresión "secuencia de control de la expresión" tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos, que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias adecuadas de iniciación de la transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. La expresión "secuencias de control" se entiende que incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

"Transformación", tal como se define en el presente documento, se refiere a cualquier proceso a través del cual el ADN exógeno entra en una célula hospedadora. La transformación puede tener lugar bajo condiciones naturales o artificiales usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extrañas en una célula hospedadora procariota o eucariota. El método se selecciona basándose en la célula hospedadora que se transforma y puede incluir, pero no se limita a, infección vírica, electroporación, lipofección y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable en las que el ADN insertado es capaz de replicarse, ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma hospedador. También incluyen células que expresan de manera transitoria el ADN o el ARN insertado durante períodos de tiempo limitados.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), tal y como se emplea en el presente documento, se entiende que se refiere a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Debe entenderse que tales expresiones se refieren no solo a la célula objeto particular, sino a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas a causa de una mutación o de influencias ambientales, tal progenie puede de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero sigue estando incluida dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora", tal y como se emplea en el presente documento. Particularmente, las células hospedadoras incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas a partir de cualquiera de los reinos vivos. Células eucariotas particulares incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. En células hospedadoras particulares se incluyen pero no se limitan a la línea celular procariota *E. coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden utilizar técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar según las especificaciones del fabricante o como se realiza generalmente en la técnica, o tal y como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se pueden llevar a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

Un "organismo transgénico", tal y como se conoce en la técnica y como se utiliza en este documento, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén que se introduce en el organismo (o en un progenitor del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgén" es una estructura artificial de ADN, que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un organismo transgénico, que dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o varios tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "modular" se utilizan indistintamente y, tal y como se emplean en el presente documento, se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de RAGE). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o una función de la molécula de interés. Actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de la unión, actividad enzimática, activación del receptor celular y transducción de señales.

En consecuencia, el término "modulador", tal y como se emplea en esta memoria, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o una función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de RAGE). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o una disminución de la magnitud de una

determinada actividad o función de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador.

5 El término "agonista", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un aumento en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del agonista. Agonistas particulares de interés pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos de RAGE o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se une a RAGE.

10 El término "antagonista", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca una disminución de la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del antagonista. Antagonistas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Los pepticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO01/83525.

15 Antagonistas particulares de interés incluyen los que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de RAGE. Los antagonistas de RAGE pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se une a RAGE, en particular anticuerpos monoclonales que interaccionan con la molécula de RAGE. Cabe señalar que la interacción con RAGE puede dar como resultado la unión y la neutralización de otros componentes de ligandos/membrana celular y puede ser útil para un funcionamiento aditivo o sinérgico frente a múltiples enfermedades.

20 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o la duración de un trastorno o de uno o varios de sus síntomas, evitar el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, el inicio o la progresión de uno o varios síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o aumentar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico).

25 El término "muestra", tal y como se emplea en este documento, se emplea en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", tal y como se emplea en este documento, incluye, pero no se limita a cualquier cantidad de una sustancia procedente de un ser vivo o que anteriormente era un ser vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a sangre, suero, orina, líquido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

30 **2. Realizaciones específicas**

Las realizaciones específicas tal y como se describen en este documento, se enumeran a continuación:

1. Una proteína de unión aislada que se disocia de RAGE humano con una K_D de 1×10^{-7} M o menor y una tasa constante k_{off} de $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial.

2.

35 i) La proteína de unión de la realización 1, que se une a RAGE humano y modula, en particular inhibe, la capacidad de RAGE para unirse a al menos uno de sus ligandos, tal como se determina en un ensayo estándar *in vitro*, como por ejemplo, un ensayo HTRF, como se describe, por ejemplo, con más detalle en la parte experimental, en particular, los ejemplos 4 y 5 y las referencias citadas en los mismos.

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

40 iii) Una proteína de unión, en particular, de acuerdo con una de las realizaciones anteriores, que tiene al menos una de las siguientes actividades biológicas:

a. inhibición de la reducción inducida por el péptido A β 1-40 soluble del volumen sanguíneo cerebral (VSC) *in vivo* en un modelo animal, tal como ratones C57BL/6 hembra, como se describe, por ejemplo, con más detalle en la parte experimental, en particular, en el ejemplo 10 y las referencias citadas en el mismo;

45 b. mejora del volumen sanguíneo cerebral *in vivo* en un modelo animal que hiperexpresa APP humana, como el modelo de ratón transgénico Tg2576, como se describe, por ejemplo, con más detalle en la parte experimental, en particular, en el ejemplo 16 y las referencias citadas en el mismo;

50 c. reducción del número de placas amiloides y/o del área de placas amiloides *in vivo* en un modelo animal que hiperexpresa APP humana, como el modelo de ratón transgénico Tg2576, como se describe, por ejemplo, con más detalle en la parte experimental, en particular, en el ejemplo 19 y las referencias citadas en el mismo;

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

como se describe, por ejemplo, con más detalle en la parte experimental, en particular, en el ejemplo 17 y las referencias citadas en el mismo;

e. reversión de la reducción inducida con el globulómero Aβ1-42 de la transmisión sináptica *in vitro*, determinada en cultivos de cortes de hipocampo, como se describe, por ejemplo, con más detalle en la parte experimental, en particular, en el ejemplo 18 y las referencias citadas en el mismo.

- 5
3. La proteína de unión de la realización 1 o 2, en donde el ligando se selecciona a partir de péptidos Aβ, globulómeros Aβ, S100b y anfoterina.
4. La proteína de unión de una de las realizaciones anteriores, que es una proteína de unión neutralizante.
- 10 5. La proteína de unión de una de las realizaciones anteriores, que es capaz de bloquear, en particular de inhibir, la unión del globulómero Aβ a RAGE humano.
6. La proteína de unión de una de las realizaciones anteriores en donde dicho globulómero Aβ es Aβ1-42.
7. La proteína de unión de una de las realizaciones anteriores, en donde dicha proteína de unión interacciona con al menos uno, como por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de aminoácidos del dominio C1 y/o el dominio C2 de RAGE humano.
- 15 8. La proteína de unión de acuerdo con una de las realizaciones precedentes, que es un anticuerpo humanizado.
9. La proteína de unión de acuerdo con una de las realizaciones anteriores, que comprende un dominio de unión a antígeno, siendo dicha proteína de unión capaz de unirse a un epítipo de una molécula de RAGE humano, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de
- 20 el grupo CDR-H3 de secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NO: 4, 12 y 20; y secuencias de aminoácidos de CDRs 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% de identidad con una de dichas secuencias;
- 25 el grupo CDR-L3 de secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NO: 8, 16 y 24; y secuencias de aminoácidos de CDRs 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% de identidad con una de dichas secuencias.
10. Una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, siendo dicha proteína de unión capaz de unirse a un epítipo de una molécula de RAGE humano, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de:
- 30 el grupo CDR-H3 de secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NO: 4, 12 y 20; y secuencias de aminoácidos de CDRs 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% de identidad con una de dichas secuencias;
- el grupo CDR-L3 de secuencias de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 8, 16 y 24; y secuencias de aminoácidos de CDRs 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% de identidad con una de dichas secuencias.
- 35 11. La proteína de unión de acuerdo con una de las realizaciones anteriores, que comprende además al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo CDR-H1 que consiste en SEQ ID NO: 2, 10, 18; o seleccionada a partir del grupo CDR-H2 que consiste en SEQ ID NO: 3, 11, 19; o seleccionada a partir del grupo CDR-L1 que consiste en SEQ ID NO: 6, 14, 22; o seleccionada a partir del grupo CDR-L2 que consiste en SEQ ID NO: 7, 15, 23;
- 40 y secuencias de aminoácidos de CDRs 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% de identidad con una de dichas secuencias.
12. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en:

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

ES 2 579 554 T3

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

13. La proteína de unión de acuerdo con la realización 12, que comprende al menos 3 CDRs que se seleccionan a partir de un conjunto de dominios de CDRs que consiste en:

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 donde al menos una de dichas 3 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% de identidad con la secuencia parental.

- 5 14. La proteína de unión de acuerdo con la realización 13, que comprende al menos dos conjuntos de CDRs de dominio variable.
15. La proteína de unión de acuerdo con la realización 14, en donde dichos al menos dos conjuntos de CDRs de dominio variable se seleccionan a partir de un grupo que consiste en:
- conjunto VH 7F9 y conjunto VL 7F9;
- 10 conjunto VH 4E5 y conjunto VL 4E5 y
- conjunto VH 11E6 y conjunto VL 11E6.
16. La proteína de unión de acuerdo con una de las realizaciones anteriores, que comprende además una región estructural aceptora humana.
- 15 17. La proteína de unión de acuerdo con la realización 16, en donde dicha región estructural aceptora humana comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 y 55
18. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada seleccionado a partir de SEQ ID NO: 56 y 57; y/o al menos un dominio variable de cadena ligera seleccionado a partir de SEQ ID NO: 58 y 59.
- 20 19. La proteína de unión de la realización 18, en donde dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas a partir de:
- SEQ ID NOs: 56 y 58; 56 y 59;
- SEQ ID NOs: 57 y 58; 57 y 59.
- 25 20. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 19, en donde dicha región estructural aceptora humana comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región estructural en un residuo clave, en donde dicho residuo clave se selecciona a partir del grupo que consiste en:
- un residuo adyacente a una CDR;
- un residuo de un sitio de glicosilación;
- un residuo raro;
- 30 un residuo capaz de interactuar con un epítipo de RAGE;
- un residuo capaz de interactuar con una CDR;
- un residuo canónico;
- un residuo de contacto entre una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera;
- un residuo dentro de una zona Vernier;
- 35 un residuo N-terminal capaz de formar para-glutamato; y
- un residuo en una región que se solapa entre una CDR1 variable de cadena pesada definida por Chothia y una primera región estructural de cadena pesada definida por Kabat.
21. La proteína de unión de acuerdo con la realización 20, en donde dicho residuo clave se selecciona a partir del grupo que consiste en

(posición en la secuencia de la cadena pesada): 1, 2, 68, 70, 72, 76, 85, 89, 95

(posición en la secuencia de la cadena ligera): 11, 13, 43, 49, 58, 70, 87.

22. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la proteína de unión es un dominio variable humano de consenso.

5 23. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones 16 a 22, en donde dicha región estructural aceptora humana comprende al menos una sustitución de aminoácidos de la región estructural, tal como por ejemplo 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 sustituciones, en donde la secuencia de aminoácidos de la región estructural es al menos un 65% idéntica a la secuencia de dicha región estructural aceptora humana y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos idénticos a dicha región aceptora humana.

10 24. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable (mutado en la región estructural) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en:

(secuencias de la cadena pesada) SEQ ID NO: 62, 67, 68 y 69;

(secuencias de la cadena ligera) SEQ ID NO: 63, 64, 65 y 66.

15 25. La proteína de unión de la realización 24, en donde dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas a partir de los grupos que consisten en:

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;

20 SEQ ID NOs: 68 y 63; 68 y 64; 68 y 65; 68 y 66.

26. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a una diana seleccionada a partir de moléculas RAGE.

27. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones anteriores, capaz de unirse a RAGE humano.

25 28. La proteína de unión de la realización 27, que tiene por lo menos una de las siguientes características funcionales adicionales:

unión a RAGE de ratón y rata.

29. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la proteína de unión es capaz de modular, en particular de neutralizar, una función biológica de una diana, seleccionada a partir de moléculas RAGE.

30 30. La proteína de unión de la realización 29, en donde dicha proteína de unión modula, en particular inhibe, la capacidad de RAGE para unirse al menos a uno de sus ligandos.

31. La proteína de unión de la realización 30, en donde dicha proteína de unión modula, en particular inhibe, al menos una de las siguientes interacciones:

unión de RAGE humano a péptidos A β , globulómeros A β , S100b y anfoterina.

35 32. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicha proteína de unión es capaz de neutralizar una actividad biológica de RAGE, como por ejemplo la escisión de dinamina inducida por A β en neuronas primarias, déficits sinápticos inducidos por globulómeros en cortes de hipocampo, disminución del VSC inducida con A β .

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

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

45 35. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicha proteína de unión tiene una tasa constante de asociación (k_{on}) para dicha diana, seleccionada entre el grupo que consiste en: 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 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial.

36. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicha proteína de unión tiene

una tasa constante de disociación (k_{off}) para dicha diana, seleccionada entre el grupo que consiste en: 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 $10^{-6}s^{-1}$, tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial.

5 37. La proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) para dicha diana, seleccionada entre el grupo que consiste en: 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.

10 38. Una estructura artificial de anticuerpo que comprende una proteína de unión descrita en una cualquiera de las realizaciones anteriores, comprendiendo dicha estructura artificial de anticuerpo adicionalmente un polipéptido enlazador o un dominio constante de inmunoglobulina.

39. La estructura artificial de anticuerpo de acuerdo con la realización 38, en donde dicha proteína de unión se selecciona a partir del grupo que consiste en:

- 15 una molécula de inmunoglobulina,
 un anticuerpo monoclonal,
 un anticuerpo quimérico,
 un anticuerpo injertado con CDR,
 un anticuerpo humanizado,
- 20 un Fab,
 un Fab',
 un F(ab')₂,
 un Fv,
 un Fv enlazado con disulfuro,
- 25 un scFv,
 un anticuerpo de dominio sencillo,
 un diacuerpo,
 un anticuerpo multiespecífico,
 un anticuerpo de especificidad doble,
- 30 una inmunoglobulina de dominio variable doble y
 un anticuerpo biespecífico.

40. La estructura artificial de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 38 y 39, en donde dicha proteína de unión comprende un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado a partir del grupo que consiste en:

- 35 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,
- 40 un dominio constante de IgE humana,
 un dominio constante de IgD humana,
 un dominio constante de IgA1 humana

un dominio constante de IgA2 humana

un dominio constante de IgY humana y

los correspondientes dominios mutados.

- 5 41. La estructura artificial de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de 38 a 40, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 25, 41, 42 y 26.
- 10 42. Un conjugado de anticuerpo que comprende una estructura artificial de anticuerpo descrita en una cualquiera de las realizaciones 38 a 41, comprendiendo además dicho conjugado de anticuerpo un agente seleccionado a partir del grupo que consiste en; una molécula de inmuno adhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico.
43. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la realización 42, en donde dicho agente es un agente de formación de imágenes seleccionado a partir del grupo que consiste en un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético y biotina.
- 15 44. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la realización 43, en donde dicho agente de formación de imágenes es un radiomarcador seleccionado a partir del grupo que consiste en: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm .
- 20 45. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la realización 42, en donde dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado a partir del grupo que consiste en; un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.
46. La estructura artificial de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de 38 a 41, en donde dicha proteína de unión posee un patrón de glicosilación humano.
47. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de 42 a 45, en donde dicha proteína de unión posee un patrón de glicosilación humano.
- 25 48. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 37, en donde dicha proteína de unión existe como un cristal.
49. La estructura artificial de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 38 a 41, en donde dicha estructura artificial de anticuerpo existe como un cristal.
- 30 50. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 42 a 45, en donde dicha estructura artificial de anticuerpo existe como un cristal.
51. La proteína de unión de acuerdo con la realización 48, en donde dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada, exento de soporte.
52. La estructura artificial de anticuerpo de acuerdo con la realización 49, en donde dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada, exento de soporte.
- 35 53. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la realización 50, en donde dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada, exento de soporte.
54. La proteína de unión de acuerdo con la realización 48, en donde dicha proteína de unión tiene una mayor semivida *in vivo* que el homólogo soluble de dicha proteína de unión.
- 40 55. La estructura artificial de anticuerpo de acuerdo con la realización 49, en donde dicha estructura artificial de anticuerpo tiene una mayor semivida *in vivo* que el homólogo soluble de dicha estructura artificial de anticuerpo.
56. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la realización 50, en donde dicho conjugado de anticuerpo tiene mayor semivida *in vivo* que el homólogo soluble de dicho conjugado de anticuerpo.
57. La proteína de unión de acuerdo con la realización 48, en donde dicha proteína de unión conserva la actividad biológica.
- 45 58. La estructura artificial de anticuerpo de acuerdo con la realización 49, en donde dicha estructura artificial de anticuerpo conserva la actividad biológica.
59. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la realización 50, en donde dicho conjugado de anticuerpo conserva la actividad biológica.

60. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión de cualquiera de las realizaciones 1-37.
61. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de la estructura artificial de anticuerpo de cualquiera de las realizaciones 38-41.
- 5 62. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos del conjugado de anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones 42-45.
63. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 60 a 62.
64. El vector de la realización 63 en donde dicho vector se selecciona a partir del grupo que consiste en pcDNA, PTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE y PBJ.
- 10 65. Una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 63 y 64.
66. La célula hospedadora de acuerdo con la realización 65, en donde dicha célula hospedadora es una célula procariota.
67. La célula hospedadora de acuerdo con la realización 66, en donde dicha célula hospedadora es *E. coli*.
68. La célula hospedadora de acuerdo con la realización 67, en donde dicha célula hospedadora es una célula eucariota.
- 15 69. La célula hospedadora de acuerdo con la realización 68, en donde dicha célula eucariota se selecciona a partir del grupo que consiste en célula protista, célula animal, célula vegetal y célula fúngica.
70. La célula hospedadora de acuerdo con la realización 69, en donde dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada a partir del grupo que consiste en; una célula de mamífero, una célula aviar y una célula de insecto.
- 20 71. La célula hospedadora de acuerdo con la realización 69, en donde dicha célula hospedadora se selecciona a partir de células HEK, células CHO, células COS y células de levadura.
72. La célula hospedadora de acuerdo con la realización 71, en donde dicha célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
73. La célula hospedadora de acuerdo con la realización 70, en donde dicha célula hospedadora es una célula Sf9 de insecto.
- 25 74. Un método para producir una proteína capaz de unirse a RAGE, que comprende cultivar una célula hospedadora de una cualquiera de las realizaciones 65 a 73, en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse a RAGE.
75. Una proteína producida de acuerdo con el método de la realización 74.
- 30 76. Una composición para la liberación de una proteína de unión, comprendiendo dicha composición
- (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína como producto cristalizado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 48 a 50 y un ingrediente; y
- (b) al menos un vehículo polimérico.
77. La composición de acuerdo con la realización 76, en donde dicho vehículo polimérico es un polímero seleccionado a partir de uno o varios del grupo que consiste en: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), 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) fosfaceno], poli(orto-ésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-éter alquil vinílico, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.
- 40 78. La composición de acuerdo con la realización 76, en donde dicho ingrediente se selecciona a partir del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.
- 45 79. Un método para tratar un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con 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 vehículo farmacéuticamente aceptable.

81. La composición farmacéutica de la realización 80, en donde dicho vehículo farmacéuticamente aceptable actúa como adyuvante útil para aumentar la absorción o la dispersión de dicha proteína de unión.
82. La composición farmacéutica de la realización 81, en donde dicho adyuvante es hialuronidasa.
- 5 83. La composición farmacéutica de la realización 82 que comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el que una actividad de RAGE es perjudicial.
84. La composición farmacéutica de la realización 83, en donde dicho agente adicional se selecciona a partir del grupo que consiste en: agente terapéutico, agente formador de imágenes, agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de la cinasa; bloqueadores de moléculas de coestimulación; bloqueadores de moléculas de adhesión; anticuerpo anti-citocina o un fragmento funcional del mismo; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; 10 FK506; un marcador o indicador detectable; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un agente antimicrobiano, un agente antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación del asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o un análogo, una citocina y un antagonista de citocinas. Otros ejemplos son: Dimebon, anticuerpos anti-A β , inhibidores de beta-secretasa, moduladores de tau, potenciadores de la cognición, como por ejemplo, antagonistas de 5-HT $_6$, inhibidor de la colessterinasa (por ejemplo, tacrina, donepezilo, rivastigmina o galantamina), un bloqueador parcial del receptor de NMDA (por ejemplo, memantina), un mimético de glicosaminoglicano (por ejemplo, Alzhemed), un inhibidor o un modulador alostérico de la secretasa gamma (por ejemplo, R-flurbiprofeno), un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina que bloquea la hormona luteinizante (por ejemplo, leuporelina), un antagonista del receptor de 5-HT $_{1A}$ serotonina, un agente quelante, un bloqueador de canales de calcio de tipo L selectivo neuronal, un inmunomodulador, un inhibidor de la fibrillogénesis amiloide o un inhibidor del depósito de proteína amiloide (por ejemplo, M266), otro anticuerpo (por ejemplo, bapineuzumab), un antagonista del receptor 5-HT $_{1A}$, un inhibidor de PDE4, un agonista de histamina, una proteína del receptor para productos finales de glicación avanzada, un estimulador de PARP, un antagonista del receptor de serotonina 6, un agonista del receptor 5-HT $_4$, un esteroide humano, un estimulante de la captación de glucosa que mejora el metabolismo neuronal, un antagonista de CB1 selectivo, un agonista parcial en receptores de benzodiazepina, un antagonista o inhibidor de la producción de beta amiloide, un inhibidor del depósito de beta amiloide, un antagonista parcial de NNR alfa-7, un agente terapéutico que se dirige a PDE4, un inhibidor de la traducción del ARN, un agonista muscarínico, un agonista del receptor del factor de crecimiento nervioso, un agonista del receptor de NGF y un modulador de la terapia génica.
- 15 20 25 30
85. Un método para reducir la actividad de RAGE humano comprende poner en contacto RAGE humano con el producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59, de tal manera que se reduce la actividad de RAGE humano.
- 35 86. Un método para disminuir la unión de hRAGE al menos a un ligando seleccionado a partir de péptidos A β , globulómeros, S100b y anfoterina en un sujeto que tenga necesidad de ello, que comprende la etapa de administrar al sujeto un producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59.
87. Un método para tratar en un sujeto un trastorno asociado con la actividad de RAGE que comprende la etapa de administrar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos un producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59.
- 40 88. Un método para reducir la actividad de RAGE en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de RAGE es perjudicial, que comprende administrar al sujeto un producto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 59, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.
- 45 89. El método de la realización 88, en donde el trastorno comprende enfermedades neurológicas seleccionadas a partir del grupo que comprende esclerosis lateral amiotrófica, lesión del plexo braquial, lesión cerebral que incluye lesión cerebral traumática, parálisis cerebral, ataxia de Friedrich, Guillain Barré, leucodistrofias, esclerosis múltiple, postpolio, espina bífida, lesiones de la médula espinal, atrofia muscular espinal, tumores espinales, ictus, mielitis transversa, demencia, demencia senil, deterioro cognitivo leve, demencia relacionada con el Alzheimer, corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, enfermedad de Parkinson, síndrome de Steele-Richardson, síndrome de Down, miastenia grave, traumatismo nervioso, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión aguda, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, nefropatía diabética, sepsis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias relacionadas; diabetes y complicaciones resultantes como la retinopatía diabética, nefropatía, complicaciones vasculares; complicaciones ateroscleróticas, fibrosis pulmonar, cáncer especialmente melanomas, otras amiloidosis.
- 50 55 90. Una CDR aislada a partir de una proteína de unión como se ha definido en una cualquiera de las realizaciones 1 a 51.
91. Una proteína de unión aislada que interacciona específicamente con al menos un epítipo de una proteína del receptor de productos terminales de glicación avanzada (RAGE).

92. La proteína de unión aislada de la realización 91, en donde la proteína aislada es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une a antígeno.
93. El anticuerpo monoclonal o un fragmento que se une a antígeno de acuerdo con la realización 92, que comprende un dominio VH y un dominio VL.
- 5 94. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la realización 92, en donde dicho anticuerpo monoclonal disminuye la capacidad de RAGE para unirse a sus ligandos.
95. Los ligandos de acuerdo con la realización 94, en donde los ligandos comprenden péptidos A β , globulómeros, S100b y anfoterina.
- 10 96. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la realización 92, en donde dicho anticuerpo es capaz de bloquear la unión de un globulómero A β con RAGE.
97. El anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une a antígeno según la realización 92 en donde el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno comprende:
- una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 9 y SEQ ID NO. 17;
- 15 una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 21;
- una región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina gamma 1 humana con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 25; y
- 20 una región constante de cadena ligera de una inmunoglobulina kappa humana con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 26.
98. El anticuerpo monoclonal de la realización 93, en donde el dominio que se une a antígeno comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de homología con la secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19 y 20.
- 25 99. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la realización 93, en donde 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 a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 9 y SEQ ID NO. 17.
100. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la realización 99, en donde dicho dominio VH comprende al menos una región CDR que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de homología con la secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 10, 11, 12, 18, 19 y 20.
- 30 101. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la realización 100, en donde dicho dominio VH comprende al menos tres regiones CDRs seleccionadas a partir 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 de acuerdo con la realización 93, en donde 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 a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 21.
- 35 103. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la realización 102, en donde 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 a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 6, 7, 8, 14, 15, 16, 22, 23 y 24.
- 40 104. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la realización 103, en donde dicho dominio VL comprende al menos tres regiones CDRs seleccionadas a partir del conjunto de SEQ ID NOs: 6, 7, 8; SEQ ID NOs. 14, 15, 16; SEQ ID NOs. 22, 23 y 24.
105. El anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno de la realización 92, en donde dicho anticuerpo o fragmento que se une a antígeno es un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo quimérico, un fragmento que se une a antígeno de un anticuerpo humanizado o un fragmento que se une a antígeno de un anticuerpo quimérico.
- 45 106. El anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno de la realización 92, en donde dicho anticuerpo o fragmento que se une a antígeno es un fragmento que se une a antígeno seleccionado a partir del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fv.
- 50 107. Una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une a

antígeno de acuerdo con la realización 96.

108. La línea celular de hibridoma de la realización 107, en donde el hibridoma se selecciona a partir del grupo que consiste en hibridoma de ratón, ser humano, rata, oveja, cerdo, vaca, cabra y caballo.

5 109. Una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente al menos a un epítipo de una proteína de RAGE.

110. La línea celular de hibridoma de la realización 107, en donde el hibridoma se selecciona a partir del grupo que consiste en hibridoma de ratón y de ser humano.

111. La línea celular de hibridoma de la realización 107, en donde el hibridoma se selecciona a partir del grupo que consiste en hibridoma de rata, oveja, cerdo, vaca, cabra y caballo.

10 112. 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 donde dicho vector se selecciona a partir del grupo que consiste en pcDNA; pTT; pTT3; pEFBOS; pBV; pJV; y pBJ.

15 113. Una célula hospedadora transformada con el vector de acuerdo con la realización 112, en donde la célula hospedadora se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica.

114. La célula hospedadora de la realización 113, en donde la célula animal es una célula de mamífero seleccionada a partir del grupo que comprende HEK293, CHO y COS.

20 115. Un método para producir la proteína de unión aislada de acuerdo con la realización 91, que comprende cultivar una célula hospedadora en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir la proteína de unión, recoger los medios de cultivo y purificar la proteína de unión aislada producida.

116. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal o una porción que se une a antígeno de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 99 o 102 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

117. Un método para tratar una enfermedad o un trastorno que comprende la administración de los anticuerpos monoclonales de las realizaciones 99 o 102 que se unen al dominio C2 en RAGE.

25 118. El método de la realización 117, en el que el trastorno comprende enfermedades neurológicas seleccionadas a partir del grupo que comprende esclerosis lateral amiotrófica, lesión del plexo braquial, lesión cerebral que incluye lesión cerebral traumática, parálisis cerebral, ataxia de Friedrich, Guillain Barré, leucodistrofias, esclerosis múltiple, postpolio, espina bífida, lesión de la médula espinal, atrofia muscular espinal, tumores espinales, ictus, mielitis transversa, demencia, demencia senil, deterioro cognitivo leve, demencia relacionada con el Alzheimer, corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, enfermedad de Parkinson, síndrome de Steele-Richardson, síndrome de Down, miastenia grave, traumatismo nervioso, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión aguda, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, nefropatía diabética, sepsis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias relacionadas.

30

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

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

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

122. El anticuerpo de la realización 121, en donde las mutaciones se seleccionan a partir de retromutaciones estructurales y mutaciones de Vernier y residuos de interconexión de VH/VL.

45 123. Un anticuerpo o una proteína de unión de una de las realizaciones anteriores, que inhibe la unión de RAGE a un complejo de HMGB1-ADN CpG; o un anticuerpo o una proteína de unión de una de las realizaciones anteriores que no inhibe la unión de RAGE a un complejo de HMGB1-ADN CpG.

3. Generación de anticuerpos anti-RAGE

3.1. General

50 Los anticuerpos de la solicitud se pueden generar mediante la inmunización de un hospedador adecuado (por ejemplo, vertebrados, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos, reptiles, peces, anfibios y en huevos de aves, reptiles y peces). Para generar los anticuerpos de la presente solicitud, el

hospedador se inmuniza con un polipéptido de RAGE inmunogénico o un fragmento del mismo de la invención. El término "inmunización" se refiere en este documento al proceso de presentar un antígeno a un repertorio inmune tanto si ese repertorio existe en un organismo genéticamente inalterado natural, como en un organismo transgénico, incluyendo los modificados para mostrar un repertorio inmune humano artificial. Del mismo modo, una "preparación inmunogénica" es una formulación de antígeno que contiene adyuvantes u otros aditivos que aumentan la inmunogenicidad del antígeno.

La inmunización de animales se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los métodos para la inmunización de animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas y caballos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane y el documento de Patente de EE.UU. n° 5.994.619. En una realización particular, el antígeno de RAGE se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida mediante el secuestro en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador para secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. En particular, si se está administrando un polipéptido, la pauta de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, que se distribuyen a lo largo de varias semanas.

Se contempla que el animal hospedador se inmuniza con el antígeno asociado con la membrana celular de una célula intacta o alterada y los anticuerpos de la presente solicitud se identifican mediante la unión a un polipéptido inmunogénico de la invención. Después de la inmunización del animal hospedador con el antígeno, se pueden obtener anticuerpos a partir del animal. El suero que contiene los anticuerpos se obtiene a partir del animal mediante sangrado o sacrificio del animal. El suero puede usarse tal y como se obtiene del animal, una fracción de inmunoglobulina se puede obtener a partir del suero, o los anticuerpos pueden purificarse a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de este modo son policlonales, teniendo de este modo una variedad heterogénea de propiedades.

3.2 Anticuerpos monoclonales anti-RAGE que utilizan la tecnología de hibridoma

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la materia y que se describen, 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). La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se emplea en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene a partir de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procarionta y de fago, y no al método por el cual se produce.

Los métodos para producir y detectar anticuerpos específicos usando la tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En una realización, la presente invención proporciona métodos para generar 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, en particular, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención, con células de mieloma y después seleccionando los hibridomas resultantes de la fusión en busca de clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Brevemente, los ratones se pueden inmunizar con un antígeno de RAGE. En una realización particular, el antígeno de RAGE se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen el adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida mediante el secuestro en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador para secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. En particular, si se está administrando un polipéptido, la pauta de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, que se distribuyen a lo largo de varias semanas.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno de RAGE en el suero de ratón, se extirpa el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después mediante técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitada. Los clones del hibridoma se someten después a ensayo por métodos conocidos en la técnica para analizar células que secretan anticuerpos capaces de unirse a RAGE. El líquido ascítico, que generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, se puede generar mediante la inmunización de ratones con clones de hibridomas positivos.

En otra realización, los hibridomas inmortalizados que producen anticuerpos se pueden preparar a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y los linfocitos B esplénicos se fusionan con células de mieloma inmortalizadas, como se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. En una realización particular, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no

secretora). Después de la fusión y de la selección con antibióticos, los hibridomas son seleccionados utilizando RAGE o una porción del mismo, o una célula que expresa RAGE. En una realización particular, la selección inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), en particular un ELISA. Un ejemplo de detección con ELISA se proporciona en el documento WO 00/37504.

- 5 Los hibridomas productores de anticuerpos anti-RAGE se seleccionan, se clonan y se escrutan adicionalmente en busca de características deseables, que incluyen un crecimiento vigoroso del hibridoma, una producción elevada de anticuerpos y características deseables de anticuerpos, tal y como se describe más adelante. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmune, por ejemplo, ratones sin pelo, o en un cultivo celular *in vitro*. Los métodos de selección, clonación y expansión de
10 hibridomas son bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

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

- 15 Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención se pueden producir 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 la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

20 3.3 Anticuerpos monoclonales anti-RAGE utilizando SLAM

- En otro aspecto de la invención, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individuales, aislados usando un procedimiento denominado en la técnica el método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en los documentos de Patente de EE.UU. n° 5.627.052, la publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 7843-7848. En este método, células individuales que
25 secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos obtenidos a partir de uno cualquiera de los animales inmunizados descritos anteriormente, se escrutan utilizando un ensayo de placa hemolítica específico de antígeno, en el que el antígeno RAGE, una subunidad de RAGE o un fragmento del mismo, está acoplado a glóbulos rojos de oveja usando un enlazador, tal como biotina y se emplea para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad para RAGE. Después de la identificación de las células secretoras de anticuerpos de
30 interés, se rescatan los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera desde las células mediante transcriptasa inversa-PCR y estas regiones variables se pueden expresar entonces, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina adecuadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células hospedadoras de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células hospedadoras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, obtenidas a partir de linfocitos seleccionados *in vivo*, se pueden someter entonces a
35 un análisis y selección adicional *in vitro*, por ejemplo, mediante selección de las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos de RAGE. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas se pueden manipular adicionalmente *in vitro*, tal como mediante métodos de maduración por afinidad *in vitro*, tales como los descritos en los documentos de publicación PCT WO 97/29131 y la publicación PCT WO 00/56772.

3.4 Anticuerpos monoclonales anti-RAGE empleando animales transgénicos

- 40 En otra realización de la presente invención, los anticuerpos son producidos mediante la inmunización de un animal no humano que comprende algunos, o todos, los loci de inmunoglobulina humana, con un antígeno de RAGE. En una realización particular, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificado genéticamente que comprende fragmentos grandes de los loci de inmunoglobulina humana y no es capaz de producir anticuerpos de ratón. Véase, por ejemplo, Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994) y los
45 documentos de patentes de EE.UU. 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 los documentos WO 91/10741, publicado el 25 de julio 1991, WO 94/02602, publicado el 3 de febrero 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambos publicados el 31 de octubre de 1996, WO 98/16654, publicado el 23 de abril de 1998, WO 98/24893, publicado el 11 de junio 1998, WO 98/50433, publicado el 12 de noviembre 1998, WO 99/45031, publicado el 10 de septiembre 1999, WO 99/53049, publicado el 21 de octubre 1999, WO 00 09560, publicado el 24 de febrero 2000 y WO 00/037504, publicado el 29 de junio 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y genera AcMos humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos YAC de configuración de la línea germinal, con un tamaño de megabases, de los loci de la cadena ligera y los loci de la cadena pesada humana.
55 Véase Méndez 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 genotecas recombinantes de anticuerpos

Los métodos *in vitro* también se pueden emplear para preparar los anticuerpos de la invención, en donde una genoteca de anticuerpos se escruta para identificar un anticuerpo que tenga la especificidad de unión deseada. Los

métodos para tal selección de genotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos, por ejemplo, en los documentos de Ladner et al. Patente de EE.UU. n° 5.223.409; Kang et al. Publicación PCT n° WO 92/18619; Dower et al. Publicación PCT n° WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT n° WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT n° WO 92/15679; Breitling et al. Publicación PCT n° WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT n° WO 92/01047; Garrard et al. Publicación PCT n° 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; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19: 4133-4137; y Barbas et al. (1991) *PNAS* 88: 7978-7982, publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20030186374 y publicación PCT n° WO 97/29131.

La genoteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con RAGE, o una porción de RAGE. Alternativamente, la genoteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto sin tratamiento, es decir, uno que no ha sido inmunizado con RAGE, tal como una genoteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con RAGE humano. Los anticuerpos de la invención se seleccionan mediante el escrutinio de la genoteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende RAGE humano, para seleccionar de ese modo los anticuerpos que reconocen RAGE. Los métodos para llevar a cabo tal escrutinio y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se han descrito en las referencias en el párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la invención, que tienen afinidades de unión determinadas para hRAGE, tales como los que se disocian de RAGE humano con una tasa constante K_{off} determinada, el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial se puede utilizar para seleccionar anticuerpos que tienen la tasa constante K_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizante determinada sobre hRAGE, tales como los que tienen una CI_{50} determinada, se pueden emplear métodos convencionales conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hRAGE.

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

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar utilizando diversos métodos de presentación en fago conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fago, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fago, que son portadoras de las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, un fago de este tipo se puede utilizar para presentar dominios que se unen a antígenos expresados a partir de un repertorio o de una genoteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humana o murina). Un fago que expresa un dominio que se une a antígeno, que se une al antígeno de interés, se puede seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado a una superficie sólida o a una perla. Los fagos usados en estos métodos son normalmente fagos filamentosos que incluyen los dominios de unión de fd y M13, expresados a partir de un fago con dominios de anticuerpo de Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro, fusionados recombinantemente ya sea a la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Ejemplos de métodos de presentación en fago que se pueden emplear para preparar 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* 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); documentos de solicitud PCT n° PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. n° 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.

Tal y como se ha descrito en las referencias anteriores, después de la selección en fagos, las regiones que codifican el anticuerpo del fago se pueden aislar y utilizar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento que se une a un antígeno deseado y se expresa en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe con detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y $F(ab')_2$ también se pueden emplear usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento de publicación PCT WO 92/22324; 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 se pueden utilizar para producir Fvs y anticuerpos de cadena sencilla incluyen los descritos en los documentos de patente de los EE.UU. 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 escrutinio de genotecas de anticuerpos recombinantes mediante presentación en fago, otras metodologías conocidas en la técnica para el escrutinio de grandes genotecas combinatorias se puede aplicar para la identificación de anticuerpos de especificidad doble de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el que la genoteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteína, tal y como se describe en el documento de publicación PCT n° WO 98/31700 de Szostak y Roberts y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un

ARNm y el péptido o la proteína que lo codifica *in vitro*. La traducción de ARNm sintéticos que son portadores de puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, un ARNm específico se puede enriquecer a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una genoteca combinatoria) basándose en las propiedades del péptido o la proteína codificada, por ejemplo, un anticuerpo o una porción del mismo, tal como la unión del anticuerpo o una porción del mismo, con el antígeno de especificidad doble. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas gracias al escrutinio de tales genotecas, se pueden expresar por medios recombinantes tal y como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en células hospedadoras de mamífero) y, además, se pueden someter a una maduración por afinidad adicional mediante rondas adicionales de escrutinio de fusiones de ARNm-péptido en las que se han introducido mutaciones en la(s) secuencia(s) seleccionada(s) originalmente, o por otros métodos para la maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, tal y como se ha descrito anteriormente.

En otro enfoque, los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar usando métodos de presentación en levadura, conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levadura, los métodos genéticos se utilizan para anclar dominios de anticuerpo a la pared celular de la levadura y mostrarlos en la superficie de la levadura. En particular, una levadura de este tipo se puede utilizar para mostrar dominios que se unen a antígeno expresados a partir de un repertorio o una genoteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). Ejemplos de métodos de presentación en levadura que se pueden utilizar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos por Wittrup, et al., documento de patente de EE.UU. n° 6.699.658.

4. Producción de anticuerpos recombinantes particulares de la invención para RAGE

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión desde células hospedadoras, en donde el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" se entiende que incluyen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procarionotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es preferible y lo más preferible en células hospedadoras de mamífero, porque tales células eucariotas (y en particular, las células de mamíferos) son más propensas que las células procarionotas para ensamblar y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo.

Las células hospedadoras de mamífero determinadas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, que se utilizan con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando 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 cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de purificación de proteínas.

Las células hospedadoras también se pueden utilizar para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede emplear para eliminar algo o la totalidad del ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligeras y pesadas, que no es necesario para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también se incluyen en los anticuerpos de la invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en donde una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas de un antígeno distinto de los antígenos de interés, mediante entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos de entrecruzamiento químico convencional.

En un sistema particular para la expresión recombinante de un anticuerpo, o de una porción del mismo que se une a antígeno, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo, se introduce en células CHO dhfr- mediante transfección mediada con fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están ligados funcionalmente cada uno con elementos reguladores de potenciador CMV/promotor AdMLP para dirigir niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también es portador de un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera desde el

5 medio de cultivo. Se emplean técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo desde el medio de cultivo. Aún más, la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención, cultivando 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 aislar el anticuerpo recombinante desde el medio de cultivo.

4.1 Anticuerpos anti-RAGE

La Tabla 4 es una lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de determinados anticuerpos anti-hRAGE como se describen en este documento.

10 Tabla 4: Lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de anticuerpos anti-huRAGE

SEQ ID NO	Región proteica		Secuencia
			1234567890123456789012345678901
1	VH 7F9		EEKLEESGGGLVQLGGSMKISCVASGETLSN YWMDWVRQSPENGLWIAEIRLKSNIYSTHY AESVKGRFSLSRDDSKGSVSLQMDNLTAEDT GIYFCARNAYWYFDVWGTGTTVTVSS
	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	EIRLKSNIYSTHYAESVKG
			1234567890123456789012345678901
	VH 7F9 CDR-H3	Residuos 101-108 de SEQ ID NO: 1	NAYWYFDV
5	VL 7F9		DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSATCKASQDVGT SVAWYQQKLGQSPKLLIYWTSTRHTGVPEDRF TSGSGTDFILTSNVQSEDLADYFCQQYNN YPLTFGDTKLELKE
	VL 7F9 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 5	KASQDVGTSVA
	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		QIQLVQSGPELKKPGETVKISCNASGYTFTN FGMNWVKQAFGKGLKWMGYINTNTGESIYSE EFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEOTAT YFCARSRMVTAYGMDYWGQGTSTVTVSS
	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		DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGT AVAWYQQRPGQSPKLLIFASNRYTGVPEDRF TSGSGTDFITLTLNMQPELDADYFCQQYSS YPLTFGVGKLELKE
	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

SEQ ID NO	Región proteica		Secuencia
	VL 11E6 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 13	QQYSSYPLT
17	VH 4E5		<p>QVQLQSQSGAELVRFPGTSVKVSKNA5GYAFNN YLIEWIKORPGQGLEWIGVINPGSGGTNHNE KFKVKATLTADKSSSTAYIQLSSLSLSDOSAV YFCARSAGTARARFAYWGQGLVTVSA</p>
			1234567890123456789012345678901
	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	VINPGSGGTNHNEKFKV
	VH 4E5 CDR-H3	Residuos 99-109 de SEQ ID NO: 17	SAGTARARFAY
21	VL 4E5		<p>DTQMTQSPSSISASISGERVSLTCRASQDIGS SLNWLQQEFDGTINRLDIYATSSLDSGVPKRF SGSRSGSDYSLTISLSLESEDFVDYYCLQYAS FPFTFGSGTKLEIKR</p>
	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

5 Las secuencias de CDRs del anticuerpo anti-RAGE aisladas anteriores, establecen una nueva familia de proteínas que se unen a RAGE, aisladas de acuerdo con esta invención. Para generar y seleccionar CDRs de la invención que tienen una actividad de unión y/o de neutralización de RAGE determinada con respecto a hRAGE, se pueden emplear métodos convencionales conocidos en la técnica para generar proteínas de unión de la presente invención y determinar las características de la unión y/o neutralización de RAGE de la proteína de unión, incluyendo pero no limitados a los descritos específicamente en este documento.

4.2 Anticuerpos quiméricos anti-RAGE

10 Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se obtienen a partir de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable obtenida a partir de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; documentos de patente de EE.UU. n° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Además, se pueden emplear técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 15 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) mediante el corte y empalme de genes procedentes de una molécula de anticuerpo de ratón que tiene una especificidad de antígeno apropiada, junto con genes procedentes de una molécula de anticuerpo humano con actividad biológica apropiada.

20 En una realización, los anticuerpos quiméricos de la invención se producen mediante la sustitución de la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti-RAGE humano descritos en este documento, por una región constante de IgG1 humana.

4.3 Anticuerpos anti-RAGE injertados con CDRs

25 Los anticuerpos injertados con CDRs de la invención comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano, en el que una o varias de las regiones CDRs de V_H y/o V_L se sustituyen por secuencias de CDRs no humanas, como por ejemplo, los anticuerpos murinos de la invención. Una secuencia estructural procedente de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDRs. Sin embargo, la sustitución de una cadena lineal sobre una región estructural de este tipo, conduce frecuentemente a una cierta pérdida de afinidad de la unión con el antígeno. Cuanto más homólogo sea un anticuerpo humano con el anticuerpo murino original, menos probabilidad habrá de que se combinen las CDRs murinas con la región 30 estructural humana, lo que introducirá distorsiones en las CDRs que podrían reducir la afinidad. Por lo tanto, es preferible que la región estructural variable humana que se elige para reemplazar la región estructural variable de

ratón además de las CDRs, tenga al menos una identidad de secuencia del 65% con la región estructural variable del anticuerpo murino. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDRs, tengan al menos un 70% de identidad de secuencia. Es aún más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDRs, tengan al menos 75% de identidad de secuencia. Lo más preferible es que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDRs, tengan al menos 80% de identidad de secuencia. Los métodos para producir anticuerpos injertados con CDRs son conocidos en la técnica (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); documento de patente de EE.UU. nº 5.225.539).

En una realización específica, la invención proporciona anticuerpos con CDRs injertadas con cadenas V_H y/o V_L tal y como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5: Anticuerpos injertados con CDRs

SEQ ID NO	Región de la proteína	Secuencia 123456789012345678901234567890
56 (43) (44) (45) (46)	VH-GL 11E6.1 (VH7-4.1/JH6 FR1) (VH7-4.1/JH6 FR2) (VH7-4.1/JH6 FR3) (VH7-4.1/JH6 FR4)	QVQLVQSGSELNKKGASVKYSCRAGYFTF NFGMNWVRQAPGQGLEWNGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEK TAVYYCARSRMVTAYGMDYWGQGTITVTVSS
57 (47) (44) (48) (46)	VH-GL 11E6.2 (VH1-2/JH6 FR1) (VH1-2/JH6 FR2) (VH1-2/JH6 FR3) (VH1-2/JH6 FR4)	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKYSCRAGYFTF NFGMNWVRQAPGQGLEWNGYINTNTGESIY SEEFKGRVTMTTRDTSISTAYMELSRLESDK TAVYYCARSRMVTAYGMDYWGQGTITVTVSS
58 (49) (50) (51) (52)	VL 11E6.1-GL (1-12/L5/JK2 FR1) (1-12/L5/JK2 FR2) (1-12/L5/JK2 FR3) (1-12/L5/JK2 FR4)	DIQMTQSPFSSVSASVGGDRTITCKASQNVG TAVAWYQQKQPKAPKLLIYASASNRYTGPVPS RFSGSGSGTDFTLTITSSLSQPEDPATYYCQQ YSSYPLTFGQGTKEIKR
59 (53) (54) (55) (52)	VL 11E6.2-GL (3-15/L2/JK2 FR1) (3-15/L2/JK2 FR2) (3-15/L2/JK2 FR3) (3-15/L2/JK2 FR4)	EIVMTQSPATLGVSPGERATLSCASQNVG TAVAWYQQKQPKAPKLLIYASASNRYTGPVPA RFSGSGSGTEFTLTITSSLSQSEDPFVYYCQQ YSSYPLTFGQGTKEIKR

Las secuencias de CDRs obtenidas a partir del AcMo 11E6 se indican en negrita. También se hace referencia a las secuencias estructurales específicas (FR1 a FR4), indicando las SEQ ID NOs correspondientes (véanse también las Tablas 2 y 3)

4.4 Anticuerpos anti-RAGE humanizado

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de anticuerpos de una especie no humana que se unen al antígeno deseado, que tienen una o varias regiones determinantes de complementariedad (CDRs) procedentes de la especie no humana y regiones estructurales procedentes de una molécula de inmunoglobulina humana. Secuencias de Ig humanas conocidas se describen, por ejemplo, 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.uniheidelberg.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/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/link-ks.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/linksI.html; www.recab.unihd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; 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/caewg/caewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; 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 se pueden emplear para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, la afinidad, la tasa de asociación, la tasa de disociación, la avidéz, la especificidad, la semivida o cualquier otra característica adecuada, como se conocen en la técnica. Los residuos estructurales en las regiones estructurales humanas pueden estar sustituidos con el residuo correspondiente procedente del anticuerpo donante de CDRs para alterar, en particular mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un modelado de las interacciones entre los residuos de CDRs y los estructurales para identificar los residuos estructurales importantes para la unión al antígeno y comparar las secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones determinadas. (Véase, por ejemplo, Queen et al., documento de patente de EE.UU. nº 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)). En general están disponibles modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de consenso y de importación, de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad hacia el o los antígenos diana. En general, los residuos de CDRs están implicados directamente y de forma más sustancial en afectar la unión al antígeno. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como, pero no limitados a los descritos en Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen 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); documentos de publicación PCT WO 91/09967, PCT/: 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, documentos de patente de EE.UU. nº 5.565.332, 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539; 4.816.567.

5. Realizaciones adicionales de anticuerpos de la invención

5.1 Anticuerpos de fusión e inmunoadhesinas

La presente solicitud también describe un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que se puede preparar de modo que comprenda todo o una porción de un anticuerpo de RAGE de la presente solicitud, ligado a otro polipéptido. En algunas realizaciones, solo la región variable del anticuerpo de RAGE está unida al polipéptido. En otras realizaciones, el dominio VH de un anticuerpo de RAGE de esta solicitud está ligado a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL del anticuerpo está ligado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera que permite que los dominios VH y VL interaccionen entre sí para formar un sitio de unión del anticuerpo. En otras realizaciones, el dominio VH se separa del dominio VL a través de un enlazador que permite que los dominios VH y VL interaccionen entre sí (véase a continuación en Anticuerpos de cadena sencilla). El anticuerpo VL -enlazador- VH se une después 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 de diagnóstico, tal como una enzima; que se puede visualizar fácilmente, tal como la peroxidasa de rábano picante. Además, los anticuerpos de fusión se pueden crear de modo que dos (o varios) anticuerpos de cadena sencilla estén unidos entre sí. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente con una cadena polipeptídica única, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

Una realización proporciona una proteína de unión marcada en donde un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la presente solicitud se derivatiza o se liga a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la presente solicitud se puede obtener mediante la unión funcional de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la presente solicitud (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o a varias otras entidades moleculares, tales como un ácido nucleico, otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o de la porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región del núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que se puede derivatizar un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la presente solicitud, incluyen compuestos fluorescentes. Agentes detectables fluorescentes a modo de ejemplo incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también se puede derivatizar con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una

enzima detectable, se detecta mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también se puede derivatizar con un ácido nucleico, biotina, y detectar a través de una medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina.

5.2 Anticuerpos de cadena sencilla

La presente solicitud incluye un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que se une a un RAGE inmunogénico de la invención. Para producir el scFv, el ADN que codifica VH y VL está ligado funcionalmente al ADN que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser), de manera que las secuencias de VH y VL se pueden expresar como una proteína contigua de cadena sencilla, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., 30 Nature (1990) 34 8: 552- 554). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si solo se utiliza una 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 a través de un enlazador se llaman "diacuerpo", cuya forma también está incluida en la invención.

5.3 Anticuerpos biespecíficos

La presente solicitud incluye, además, un anticuerpo biespecífico o un fragmento del mismo que se une a antígeno en el que una especificidad es para un polipéptido inmunogénico de RAGE de la presente solicitud. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico se puede generar de modo que se une específicamente a un polipéptido inmunogénico de RAGE de la invención a través de un dominio de unión, y a una segunda molécula a través de un segundo dominio de unión. Además, un anticuerpo de cadena sencilla que contiene más de una VH y VL se puede generar de modo que se une específicamente a un polipéptido inmunogénico de la invención y a otra molécula que se asocia con la atenuación del colapso en forma de cono del crecimiento mediado con mielina y la inhibición del crecimiento y el brote de neuritas. Tales anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando técnicas que son bien conocidas, por ejemplo, Fanger et al. Immunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, 20 (supra).

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

5.4 Anticuerpos derivatizados y marcados

Un anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno de la presente solicitud se puede derivatizar o enlazar a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno se derivatiza de tal manera que la unión a un polipéptido inmunogénico de la invención no se ve afectada negativamente por la derivatización o el marcador.

Por ejemplo, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la presente solicitud se puede ligar funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o a varias entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un reactivo de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o del fragmento que se une a antígeno con otra molécula (tal como una región del núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina). Aún más, un anticuerpo o una porción del mismo que se une a antígeno puede formar parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por una asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo con una o varias proteínas o péptidos adicionales o diferentes. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para preparar una molécula tetramérica scFv (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para preparar moléculas de 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 completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o con pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Por otra parte, los anticuerpos, las porciones de anticuerpo y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

Un anticuerpo derivatizado se puede producir mediante reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos claramente separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales enlazadores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un anticuerpo derivatizado también puede ser un anticuerpo marcado. Por ejemplo, agentes de detección con los que se puede derivatizar un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención son compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos lantánidos y similares. Un anticuerpo también se puede marcar con enzimas que son útiles para

la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. En realizaciones en las que está marcado con una enzima detectable, el anticuerpo se detecta mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, peroxidasa de rábano picante con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina. Un anticuerpo también puede estar marcado con biotina y se detecta a través de una medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también se puede marcar con un epítipo de polipéptido predeterminado, reconocido por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de parejas de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, epítipo: marcadores). Un anticuerpo de RAGE o un fragmento del mismo que se une a antígeno también se puede marcar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador se puede emplear tanto para fines diagnósticos como terapéuticos. El anticuerpo de RAGE radiomarcado se puede utilizar para diagnóstico, por ejemplo, para determinar los niveles de receptores RAGE en un sujeto. Además, el anticuerpo de RAGE radiomarcado se puede utilizar terapéuticamente para el tratamiento de una lesión de la médula espinal.

Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a los siguientes radioisótopos o radionucleótidos ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm . Un anticuerpo de RAGE o un fragmento del mismo que se une a antígeno también se puede derivatizar con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo de carbohidratos. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero o para aumentar la unión a tejidos. Además, un marcador para polipéptidos puede incluir un ácido nucleico, por ejemplo, ADN para una detección mediante PCR, o la mejora de la expresión génica, o ARNs para suprimir la expresión génica en células o tejidos portadores de RAGE.

La clase y la subclase de anticuerpos de RAGE se pueden determinar por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo se pueden determinar usando anticuerpos que son específicos de una clase y subclase de anticuerpo determinado. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y la subclase se pueden determinar por ELISA, transferencia Western, así como otras técnicas. Alternativamente, la clase y la subclase se pueden determinar mediante secuenciación de todos o de una porción de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas y determinando la clase y la subclase de los anticuerpos.

5.5 Inmunoglobulinas de dominio variable doble

Las proteínas o inmunoglobulinas que se unen a un dominio variable doble (DVD), tal y como se emplean en este documento, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son proteínas de unión tetravalente o multivalente, como por ejemplo divalente y tetravalente. La expresión "proteína de unión multivalente" se utiliza en esta memoria descriptiva para indicar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente está diseñada genéticamente en particular para tener dos o más sitios de unión a antígeno y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. La expresión "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Tales DVDs pueden ser monoespecíficos, es decir, capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficos, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas que se unen a DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera, se refieren a una Ig DVD. Cada mitad de una Ig DVD comprende un polipéptido DVD de cadena pesada y un polipéptido DVD de cadena ligera, y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDRs que participan en la unión al antígeno, por cada sitio de unión a antígeno. Las proteínas de unión DVD y los métodos de preparación de proteínas de unión DVD se describen en el documento de solicitud de patente de EE.UU. n° 11/507.050, número de publicación 20070071675. Se entiende que la presente invención comprende una proteína de unión a DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a RAGE. En particular, la proteína de unión a DVD es capaz de unirse a RAGE y a una segunda diana. La segunda diana se selecciona a partir del grupo que consiste en actividades de AcMo antiinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-23, TNF alfa/beta, IFN-beta, gamma, LIF, OSM, CNTF, PF-4, proteína básica de las plaquetas (PBP), NAP-2, beta-TG, MIP-1, MCP2/3, RANTES, linfotactina), de proteínas que median en el transporte (receptor de insulina, receptor de transferrina, receptor de trombina, receptor de leptina, receptor de LDL), de otros AcMos neuroregenerativos (NgR, Lingo, p75, CSPG (por ejemplo, NG-2, neurocano, brevicano, versicano, agregano) ácido hialurónico, mAG, tenascina, NI-35, NI-250, IMP, perlecano, neurocano, fosfacano, nogo-A, OMGP, Sema4D, Sema 3A, efrina B3, efrina A2, efrina A5, MAG, EphA4, plexina B1, TROY, wnts, ryk rec., BMP-2, BMP-4, BMP-7), de actividades de AcMo neuroprotectores (EGF, EGFR, Sema 3), de AcMos anti-beta amiloide (por ejemplo, m266, 3D6 (bapineuzumab), AcMo anti-globulímero 7C6), de receptores y transportadores localizados en el SNC (receptores de serotonina, receptores de dopamina, DAT, Asc-1, GlyT1).

5.6 Anticuerpos de especificidad doble

La presente solicitud también describe la tecnología de "anticuerpo de especificidad doble". Los anticuerpos de especificidad doble pueden servir como agonistas, antagonistas o ambos en diferentes combinaciones. Los anticuerpos de especificidad doble son anticuerpos en los que la cadena VH se une a un primer antígeno y la cadena VL se une a otro antígeno, tal y como se ejemplifica en el documento WO2008082651.

5.7 Anticuerpos cristalizados

Otra realización de la presente solicitud proporciona una proteína de unión cristalizada. El término "cristalizado" tal como se utiliza en este documento, se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento del mismo que se une a un antígeno, que existe en forma de cristal. Los cristales son una forma de 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 matrices de átomos, iones, moléculas regulares, repetitivas, tridimensionales (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o estructuras moleculares (por ejemplo, complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien conocidas en la materia. La unidad fundamental, o elemento básico, que se repite en un cristal se llama la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica dada, bien definida, proporciona la "celda elemental" del cristal. La repetición de la celda elemental mediante transformaciones 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., págs. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

En particular, la presente solicitud describe cristales de anticuerpos de RAGE completos y fragmentos de los mismos tal y como se describen en este documento, y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una realización, la proteína de unión cristalizada tiene una mayor semivida *in vivo* que el homólogo soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión conserva la actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de unión cristalizada de la invención se puede producir según métodos conocidos en la técnica y tal y como se describen en el documento WO 02072636.

5.8 Anticuerpos glicosilados

Otra realización de la invención proporciona una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o la porción del mismo que se une a un antígeno comprende uno o varios residuos de carbohidrato. La producción de una proteína naciente *in vivo* se puede someter a un procesamiento adicional, conocido como modificación post-traduccional. En particular, residuos de azúcar (glicosilo) se pueden añadir enzimáticamente, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que son portadoras de cadenas laterales de oligosacáridos unidos covalentemente, se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o varios residuos de carbohidrato en el dominio Fc, así como en el dominio variable. Los residuos de carbohidrato en el dominio Fc tienen un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo sobre la unión al antígeno o la semivida del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), págs. 11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de la unión del anticuerpo, probablemente debido a impedimento estérico (Co, M.S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367), o como resultado de un aumento de la afinidad hacia 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 donde se ha mutado el sitio de glicosilación ligado a O o a N de la proteína de unión. Un experto en la técnica puede generar tales mutantes empleando tecnologías convencionales bien conocidas. Los mutantes del sitio de glicosilación que conservan la actividad biológica, pero han aumentado o disminuido la actividad de unión, son otro objeto de la presente invención.

En aún otra realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo o de la porción que se une a un antígeno de la invención. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo no glicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, mediante la alteración de uno o varios sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o varias sustituciones de aminoácidos dando como resultado la eliminación de uno o varios sitios de glicosilación de la región variable, para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Una falta de glicosilación de este tipo puede aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Este enfoque se describe con más detalle en el documento de publicación PCT WO2003016466A2 y la patente de los EE.UU. nº 5.714.350.

Adicional o alternativamente, un anticuerpo modificado de la invención se puede preparar de forma que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tiene más estructuras GlcNAc bisecadas. Tales patrones de glicosilación alterados han mostrado que aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora que tiene la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células hospedadoras en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con la 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 el documento de Patente Europea nº: EP 1.176.195; publicaciones PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80.

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 (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas) y tienen diferentes sustratos (azúcares nucleótidos) disponibles. Debido a estos factores, el patrón de glicosilación de las proteínas y la composición de los residuos de glicosilo, pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se expresa la proteína en particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no están limitados a glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. En particular, la proteína de unión glicosilada comprende residuos de glicosilo de modo que el patrón de glicosilación es humano.

Es conocido por los expertos en la técnica que una glicosilación diferente de las proteínas puede dar como resultado características diferentes de las proteínas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo hospedador, tal como levadura, y que se ha glicosilado utilizando la ruta endógena de la levadura, se puede reducir en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y muestran una reducción de la semivida *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en los seres humanos y otros animales pueden reconocer residuos de glicosilo específicos y favorecer un aclaramiento rápido de la proteína desde la sangre. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de las proteínas, la solubilidad, la susceptibilidad a proteasas, el tráfico, el transporte, la compartimentalización, la secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, la antigenicidad o la alergenicidad. Por consiguiente, un especialista puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición y un patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, a los producidos en células humanas o en las células específicas de la especie del animal objeto previsto.

Una expresión diferente de las proteínas glicosiladas a las de una célula hospedadora, se puede conseguir mediante una modificación genética de la célula hospedadora para que exprese enzimas de glicosilación heterólogas. Utilizando técnicas conocidas en la materia, un experto puede generar anticuerpos o porciones de los mismos que se unen a antígeno que muestran una glicosilación de proteína humana. Por ejemplo, cepas de levadura han sido modificadas genéticamente para que expresen enzimas de glicosilación no naturales de modo que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura muestren una glicosilación de proteínas idéntica a la de las células animales, especialmente las células humanas (documentos de solicitudes de patente de EE.UU. 20040018590 y 20020137134 y publicación PCT WO2005100584 A2).

Además, un experto en la técnica apreciará que una proteína de interés se puede expresar usando una genoteca de células hospedadoras manipulada genéticamente para expresar diversas enzimas de glicosilación, de modo que las células hospedadoras miembros de la genoteca producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variados. A continuación, un especialista puede seleccionar y aislar la proteína de interés con determinados patrones de glicosilación novedosos. Particularmente, la proteína que tiene un nuevo patrón de glicosilación seleccionado en particular, muestra propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

5.9 Anticuerpos anti-idiotípicos

Además de las proteínas de unión, la presente descripción también se refiere a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico de tales proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo, que reconoce determinantes especiales, asociados generalmente a la región que se une a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar mediante inmunización de un animal con la proteína de unión o una CDR que contiene una región de la misma. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo un anticuerpo denominado anti-anti-Id.

6. Usos de los anticuerpos

Teniendo en cuenta su capacidad para unirse a RAGE humano, los anticuerpos neutralizantes de la presente solicitud, o porciones de los mismos, se pueden utilizar para detectar RAGE humano (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejidos. La presente solicitud proporciona un método para detectar RAGE humano en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o una porción de anticuerpo, de la invención y detectar o bien el anticuerpo (o una porción de anticuerpo) unido a RAGE humano o el anticuerpo no unido (o una porción de anticuerpo), para detectar de ese modo RAGE humano en la muestra biológica. El anticuerpo está marcado directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las 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, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos 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 materiales radiactivos adecuados incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm .

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la presente solicitud en particular son capaces de neutralizar la actividad de RAGE humano tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, tales anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden emplear para inhibir la unión de RAGE a sus ligandos y, por lo tanto, neutralizar la actividad resultante.

5 En otra realización, la presente solicitud proporciona un método para reducir la actividad de RAGE en un sujeto, ventajosamente en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en el que la actividad resultante de RAGE es perjudicial. La presente solicitud proporciona métodos para reducir la actividad de RAGE en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno de este tipo, evitando la unión de RAGE a al menos uno de sus ligandos, como los globulímeros A β , a través del uso de los anticuerpos monoclonales de la presente solicitud. Los anticuerpos de la
10 presente invención, en particular, los anticuerpos humanizados descritos en este documento, se pueden administrar a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, los anticuerpos de la presente solicitud se pueden administrar a un mamífero no humano que expresa un RAGE con el que el anticuerpo es capaz de unirse con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. En relación con esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, pruebas de dosificaciones y
15 cursos temporales de administración).

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "un trastorno en el que la actividad de RAGE es perjudicial" se entiende que incluye enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado que la presencia de RAGE o su actividad resultante en un sujeto que padece el trastorno, es responsable o es sospechosa de ser responsable de la fisiopatología del trastorno o de un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un
20 trastorno en el que la actividad de RAGE es perjudicial, es un trastorno en el que se espera que una reducción de la actividad de RAGE alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la invención incluyen aquellos trastornos descritos en la sección siguiente, que pertenecen a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Se reconoce que RAGE tiene un papel importante en la patología asociada con una variedad de enfermedades que implican enfermedades neurológicas seleccionadas a partir del grupo que comprende esclerosis lateral amiotrófica, lesión del plexo braquial, lesión cerebral que incluye lesión cerebral traumática, parálisis cerebral, ataxia de Friedrich, Guillain Barré, leucodistrofias, esclerosis múltiple, postpolio, espina bífida, lesiones de la médula espinal, atrofia muscular espinal, tumores espinales, ictus, mielitis transversa, demencia, demencia senil, deterioro cognitivo leve, demencia relacionada con el Alzheimer, corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, enfermedad de Parkinson, síndrome de Steele-Richardson, síndrome de Down, miastenia grave, traumatismo nervioso, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión aguda, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, nefropatía diabética, sepsis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias relacionadas. La diabetes y complicaciones resultantes como retinopatía diabética, nefropatía, complicaciones vasculares; complicaciones ateroscleróticas, fibrosis pulmonar, cáncer especialmente melanomas, otras amiloidosis. (Véanse, por ejemplo, las siguientes referencias: 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 de la diabetes: Yan SD et al.: Eur J Clin Invest. 1997 Mar; 27(3):179-81; enfermedades relacionadas con el prión: 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 supl 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; enfermedades autoinmunes en general, sepsis: Liliensiek B et al.: J Clin Invest. 2004 Jun; 113(11):1641-50; arteriosclerosis y reestenosis: Schmidt AM et al.: Circ Res. 1999 Mar 19; 84(5):489-97).

Además, como se ha indicado anteriormente, las inmunoglobulinas DVD o los anticuerpos de especificidad doble entre una cualquiera de las parejas descritas anteriormente, pueden ser de utilidad. Tales preparaciones de anticuerpos como se han descrito anteriormente, pueden ser útiles para el tratamiento de tales enfermedades.

50 Los anticuerpos de la presente solicitud también se pueden combinar con péptidos que permiten la transferencia transmembranal para incluir la focalización de proteínas diana intracelulares. Tales secuencias de péptidos pueden incluir, pero no se limitan a tat, antennapedia, poli-args, algunos péptidos antimicrobianos. Tales péptidos pueden permitir la transferencia a través de membranas, incluyendo membranas plasmáticas celulares, pero también el epitelio y las membranas endoteliales, incluyendo la barrera hematoencefálica, la mucosa intestinal, las meninges y
55 otras.

Un anticuerpo, o una porción de anticuerpo, de la presente solicitud también se puede administrar con uno o varios agentes terapéuticos adicionales de molécula pequeña, útiles en el tratamiento de trastornos en los que está implicada la actividad de RAGE, tal y como se ha descrito en los párrafos anteriores. Debe entenderse que los anticuerpos de la presente solicitud o porciones de los mismos que se unen a antígeno se pueden usar solos o en
60 combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, en donde dicho agente adicional es seleccionado por el experto en la técnica para su uso previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente

terapéutico reconocido en la técnica por ser útil en el tratamiento de la enfermedad o afección que se está tratando con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

7. Composiciones farmacéuticas

5 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o una porción del mismo que se une a antígeno, de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención son para uso, pero no limitado al mismo, en el diagnóstico, la detección o el seguimiento de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de un trastorno o uno o varios de sus síntomas y/o en la investigación. En una realización específica, una composición
10 comprende uno o varios anticuerpos de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o varios anticuerpos de la invención y uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención, para tratar un trastorno en el que la actividad de RAGE es perjudicial. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser útiles o que se han utilizado o se utilizan actualmente en la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de un trastorno o uno o varios de sus síntomas. De acuerdo con
15 estas realizaciones, la composición puede comprender además un vehículo, un diluyente o un excipiente.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Normalmente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se emplea en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes,
20 medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o varios entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, 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. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia del anticuerpo o de una porción de anticuerpo.

Se conocen distintos sistemas de entrega y se pueden utilizar para administrar uno o varios anticuerpos de la invención o la combinación de uno o varios anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o un agente terapéutico útil para prevenir, controlar, tratar o mejorar un trastorno o uno o varios de sus síntomas, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), la administración epidural, la administración intratumoral y la administración mucosal (por ejemplo, las vías intranasales y orales). Además, la administración pulmonar se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente para aerosol. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente de EE.UU. n° 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 n° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización, un anticuerpo de la invención, una terapia de combinación o una composición de la invención se administra usando la tecnología de administración 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 vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, 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 en el área que requiere un tratamiento; esto se puede conseguir, por ejemplo y no a modo de limitación, mediante infusión local, inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, que incluye membranas y matrices, tales como membranas sialísticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissei®) o matrices de colágeno. En una realización, una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de los antagonistas de la invención se administra localmente en la zona afectada, a un sujeto para prevenir, tratar, controlar y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de la invención se administra localmente en la zona afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o varias terapias (por ejemplo, uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención de un sujeto, para prevenir, tratar, controlar y/o mejorar un trastorno o uno o varios de sus síntomas.

60 En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico se puede entregar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una realización, se puede emplear una bomba para lograr una 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, los materiales poliméricos se pueden utilizar para lograr una liberación controlada o una liberación sostenida de las terapias de la invención (véase por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (compiladores), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (compiladores), Wiley, New 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); documentos de patente de EE.UU. n.º 5.679.377; 5.916.597; 5.912.015; 5.989.463; 5.128.326; publicación PCT n.º WO 99/15154; y publicación PCT n.º WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y polioctoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está exento de impurezas lixiviables, es estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable. En aún otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede situar en las proximidades de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica, se puede utilizar para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o varios agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento de patente de los EE.UU. n.º 4.526.938, la publicación PCT WO 91/05548, publicación PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral 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.

En una realización específica, en donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retrovírico (véase el documento de patente de EE.UU. n.º 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo junto con un péptido similar a homeobox, que es conocido por entrar en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868). Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico de modo intracelular e incorporarlo dentro del ADN de la célula hospedadora para expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosa y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios, en forma de una composición farmacéutica adaptada para una administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Típicamente, las composiciones para una administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención se van a administrar por vía tópica, las composiciones se pueden formular en forma de pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para las formas de dosificación tópicas no pulverizables, se emplean normalmente formas que son de viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o varios excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica particularmente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y similares que, si se desea, están esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (por ejemplo, agentes conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones o sales) para influir sobre diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones en forma aerosol, pulverizables en las que el ingrediente activo, en particular en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un agente volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en una botella comprimible. Los agentes hidratantes o humectantes también se pueden añadir a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la invención comprende la administración intranasal de una composición, la composición se puede formular en forma de aerosol, pulverización, vaporizador o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos

o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de presentación como pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular de modo que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende una administración oral, las composiciones se pueden formular por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones y similares. Los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma, pero sin limitarse a las mismas, de soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponadas, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse convenientemente para liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente para aerosol. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente de EE.UU. n° 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 n° 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, una terapia de combinación y/o una composición de la invención se administra utilizando la tecnología de administración de fármacos pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden estar en formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril, exenta de pirógenos) antes del uso. Los métodos de la invención pueden comprender, además, la administración de composiciones formuladas como preparaciones en depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Los métodos de la invención incluyen la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones, tales como los obtenidos a partir de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con cationes tales como los obtenidos a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o un sobre, indicando la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es una infusión, la composición se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando el modo de administración es por inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, se puede proporcionar para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En particular, la invención también proporciona que uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se envase en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad de agente. En una realización, uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se suministra como un polvo liofilizado esterilizado

seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente sellado y se puede reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) hasta obtener la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En particular, uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la invención se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado, con una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más particularmente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse entre 2°C y 8°C, en su envase original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención deben ser administradas al cabo de 1 semana, particularmente al cabo de 5 días, al cabo de 72 horas, al cabo de 48 horas, al cabo de 24 horas, al cabo de 12 horas, al cabo de 6 horas, al cabo de 5 horas, al cabo de 3 horas o al cabo de 1 hora después de haber sido reconstituidos. En una realización alternativa, uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la invención se suministra en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado indicando la cantidad y la concentración del agente. En particular, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado de 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 se debe almacenar a temperaturas entre 2°C y 8°C, en su envase original.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. En particular, el anticuerpo o las porciones de anticuerpo se pueden preparar como una solución inyectable que contiene 0,1 a 250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por cualquier forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de vidrio flint o ámbar, una ampolla o una jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a un pH de 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. El cloruro de sodio se puede utilizar para modificar la toxicidad de la solución hasta una concentración de 0-300 mM (de manera óptima 150 mM para una forma de dosificación líquida). Los crioprotectores se pueden incluir para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sacarosa (de manera óptima 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Los agentes de carga se pueden incluir para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (de manera óptima 2-4%). Los estabilizadores se pueden utilizar tanto en formas de dosificación líquidas como liofilizadas, principalmente 1-50 mM de L-metionina (de manera óptima 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados que incluyen glicina, arginina, pueden incluirse como 0-0,05% de polisorbato-80 (de manera óptima, 0,005-0,01%). Tensioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención, preparada como una solución inyectable para administración parenteral, puede comprender además un agente útil como adyuvante, tal como los que se utilizan para aumentar la absorción o la dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex[®] (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de una administración parenteral, particularmente una administración subcutánea. También permite volúmenes mayores en el sitio de la inyección (es decir, superiores a 1 ml) con menos dolor y malestar, y una incidencia mínima de reacciones en el sitio de la inyección. (Véanse los documentos WO2004078140, US2006104968).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma particular depende del modo de administración pretendido y de la aplicación terapéutica. Las composiciones particulares típicas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. Un modo particular de administración es el parenteral (por ejemplo, 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 normalmente deben ser 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 una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (es decir, el anticuerpo o una porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles, liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos particulares de preparación son secado al vacío y secado por pulverización que produce un polvo de ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional deseado de su solución previamente filtrada estéril. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Una absorción prolongada de composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales

de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la presente invención se pueden administrar a través de una variedad 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 apreciará un experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá al compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilen-vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos generalmente por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, compilador, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también pueden estar incluidos en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, prensados en comprimidos o incorporados directamente en la dieta del sujeto. Para una administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y se emplean en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención por medio de una administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material para evitar su inactivación.

También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención está formulado conjuntamente y/o administrado conjuntamente con uno o varios agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos en los que la actividad de RAGE es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo o una porción de anticuerpo anti-RAGE de la invención se puede formular y/o administrar conjuntamente con uno o varios anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a citocinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, uno o varios anticuerpos de la invención se pueden emplear en combinación con dos o más de los anteriores agentes terapéuticos. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo para RAGE o un fragmento del mismo está unido a un vehículo que prolonga la semivida, conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan al dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en el documento de solicitud de EE.UU. con nº de serie 09/428.082 (concedida como US 6.660.843) y publicada como WO 00/24782 (nº de solicitud PCT/US 99/25044).

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención, se administran para tratar, prevenir, controlar o mejorar un trastorno o uno o varios síntomas del mismo mediante terapia génica. Terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o un agente profiláctico o terapéutico de la invención que media en un efecto profiláctico o terapéutico.

Se puede utilizar cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse 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; Mayo, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar están descritos por Ausubel et al. (compiladores), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). Una descripción detallada de diversos métodos de terapia génica se encuentra en el documento US20050042664 A1.

RAGE tiene un papel decisivo en la patología asociada con una variedad de enfermedades, tal y como se han definido anteriormente en este documento. La infusión de péptidos A β amiloides en animales conduce a respuestas tales como respuestas inflamatorias en arteriolosis, disminución del flujo sanguíneo cerebral. Estos efectos podrían prevenirse con anticuerpos contra RAGE (Rhodin, J. et al. *World Congress for Microcirculation*, submitted Papers, 7th, Sydney, Australia, Ago. 19-22, 2001, 543-547; Deane et al. *Nature med.* 2003). RAGE está regulado positivamente en el microsistema vascular de pacientes con EA y en ratones transgénicos en donde el gen de APP humana se ha hiperexpresado (Deane et al. *Nature Med.* 2003). Utilizando ratones doblemente transgénicos en los que se expresa el gen de APP humana y RAGE se hiperexpresa, se mostró que la hiperexpresión del gen normal de RAGE conduce a un deterioro en el aprendizaje, un aumento de placas, mientras que la hiperexpresión de una variante de RAGE que es defectuosa en la señalización y dominante negativa conduce a una mejora en el aprendizaje y disminuye los niveles de placas (Arancio et al. 2004 *EMBO J.* 2004). Una experimentación en modelos

animales de diabetes de tipo 1 y 2 revela que el antagonismo del eje ligando-RAGE suprime el desarrollo y la progresión de una alteración celular vascular e inflamatoria en un medio diabético, p. ej., ratones con el gen RAGE desactivado y anticuerpos anti-RAGE se han utilizado para mostrar una mejora en modelos animales, por ejemplo, para la nefropatía 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). Efectos renales positivos a largo plazo de un anticuerpo de RAGE neutralizante en ratones diabéticos de tipo 2, obesos, han sido mostrados por Flyvbjerg et al. (Diabetes, 2004, 53, 1, p. 166-72). Ratones con el gen RAGE desactivado se utilizaron para mostrar una participación de RAGE en la sepsis (Birgit Liliensiek et al. J 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 EAE inducida con MOG o MBP (Yan, S.S., et al. 2003. Nat. Med. 9:287-293). La participación de RAGE en el cáncer se ha demostrado (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 con el tratamiento, empleando anticuerpos anti-RAGE neutralizantes.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención se pueden usar para tratar seres humanos que padecen una enfermedad de este tipo.

Se debe entender que los anticuerpos de la invención o una porción de los mismos que se une a antígeno se pueden usar solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionando el experto en la técnica dicho agente adicional para su uso previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por ser útil para el tratamiento de la enfermedad o afección que se trata con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

Se debe entender además que las combinaciones que se incluyen dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para sus fines previstos. Los agentes que se exponen a continuación son ilustrativos para los fines y no pretenden ser limitativos. Las combinaciones, que forman parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado a partir de la lista más abajo. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es de tal modo que la composición formada puede realizar su función prevista.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los que se puede combinar un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón-β1a (AVONEX; Biogen); interferón-β1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α-n3 (Interferon Sciences/Fujimoto); interferón-α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferón α 2b (Enzon/Schering-Plough), copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos o 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 los mismos que se unen a antígeno, se pueden combinar 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 los mismos que se unen a antígeno, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINEs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de la cinasa MAP), inhibidores de la enzima de conversión de IL-1β, inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de linfocitos T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocina solubles y sus derivados (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo IL-4, IL-10, IL-13 y TGFβ).

Ejemplos particulares de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple en donde el anticuerpo o una porción del mismo que se une a antígeno, se puede combinar para incluir interferón-beta, por ejemplo, IFNβ1a e IFNβ1b; copaxona, corticosteroides, inhibidores de caspasa, por ejemplo, inhibidores de la caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF y anticuerpos para el ligando de CD40 y CD80.

En particular, las proteínas de unión y los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para tratar una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down. Se debe entender que las proteínas de unión y los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o en combinación con al menos un agente adicional adecuado para el tratamiento de una de las enfermedades anteriores. Dicho al menos un agente adicional lo puede seleccionar un experto en la técnica para su fin previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico tal como un inhibidor de colesteroles (por ejemplo, tacrina, donepezil, rivastigmina o galantamina), un

5 bloqueador parcial del receptor de NMDA (por ejemplo, memantina), un mimético de glicosaminoglicano (por ejemplo, Alzhemed), un inhibidor o modulador alostérico de la secretasa gamma (por ejemplo, R-flurbiprofeno), un agonista de la hormona de liberación de gonadotropina que bloquea la hormona luteinizante (por ejemplo, leuprorelina), un antagonista del receptor de serotonina 5-HT_{1A}, un agente quelante, un bloqueador de canales de calcio de tipo L selectivo neuronal, un inmunomodulador, un inhibidor de la fibrillogénesis amiloide o un inhibidor del depósito de proteína amiloide (por ejemplo, M266), otro anticuerpo (por ejemplo, bapineuzumab), un antagonista del receptor 5-HT_{1A}, un inhibidor de PDE4, un agonista de histamina, una proteína del receptor para productos finales de glicación avanzada, un estimulador de PARP, un antagonista del receptor de serotonina 6, un agonista del receptor 5-HT₄, un esteroide humano, un estimulante de la captación de glucosa que mejora el metabolismo neuronal, un antagonista de CBI selectivo, un agonista parcial en receptores de benzodiazepina, un antagonista o inhibidor de la producción de beta amiloide, un inhibidor del depósito de beta amiloide, un antagonista parcial de NNR alfa-7, un agente terapéutico que se dirige a PDE4, un inhibidor de la traducción del ARN, un agonista muscarínico, un agonista del receptor del factor de crecimiento nervioso, un agonista del receptor de NGF y un modulador de la terapia génica (es decir, aquellos agentes reconocidos actualmente, o que estarán reconocidos en el futuro, como útiles para tratar la enfermedad o la afección que se está tratando con el anticuerpo o la proteína de unión de la presente invención). El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

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

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y a periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la porción de anticuerpo puede ser determinada por una persona experta en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o de la porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o de la porción de anticuerpo, está superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, con dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, ya que una dosis profiláctica se emplea en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

40 Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se va a lograr y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de generar compuestos, tal como un compuesto activo tal para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

50 Un intervalo no limitativo ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, es 0,1-20 mg/kg, más particularmente 1-10 mg/kg. Es de señalar que los valores de la dosificación pueden variar según el tipo y la gravedad de la afección a aliviar. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son únicamente a modo de ejemplo y no están destinados a limitar el alcance o la puesta en práctica de la composición reivindicada.

60 Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solo para fines de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la invención.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1: Anticuerpos anti-huRAGE preferidos**1.1 Producción de hibridomas y anticuerpos.**

Ratones Balb/c y A/J, de 4-6 semanas de edad, fueron inmunizados y se reforzaron por vía subcutánea con RAGE humano. Los animales fueron inyectados cada tres semanas, comenzando con una inyección primaria de 30 µg en adyuvante completo de Freund y refuerzos con inyecciones de 30 µg en adyuvante incompleto de Freund. Se inyectó a los ratones seleccionados para la fusión por vía intravenosa 10 µg de hRAGE en solución salina, cuatro días antes de la fusión. Los bazo de los animales inmunizados se extirparon y se prepararon suspensiones de células individuales. Células SP2/0 de mieloma se recogieron del cultivo y se lavaron. Las células del bazo y las células tumorales se mezclaron en una proporción de 5:1 y se fusionaron usando 50% de PEG 3000, utilizando técnicas convencionales (Kohler y Milstein, 1975). Las células fusionadas se sembraron en placas de 96 pocillos, en medio selectivo, con 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 retiró el material sobrenadante y se sometió a ensayo en el ELISA de hRAGE.

Los hibridomas que producían AcMos con características deseadas se subclonaron por el método de dilución limitante. El material sobrenadante que contenía subclones se sometió a ensayo para estudiar la unión a hRAGE mediante ELISA. Subclases de la cadena pesada y ligera de los AcMos se determinaron utilizando el kit de isotipificación EIA Zymed.

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

Para cada determinación de la secuencia de aminoácidos, se aislaron aproximadamente 10×10^6 células de hibridoma mediante centrifugación y se procesaron para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, CA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se sometió a una síntesis de ADN de la primera cadena usando el sistema de síntesis de la primera cadena de SuperScript (Invitrogen, CA) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó oligo(dT) para cebar la síntesis de la primera cadena para seleccionar el ARN poli(A)⁺. Después, el producto de ADNc de la primera cadena se amplificó por PCR con cebadores diseñados para la amplificación de regiones variables de inmunoglobulina murina (Ig-Primer Sets, Novagen, WI). Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa, se escindieron, se purificaron y después se subclonaron en el kit de clonación de TOPO en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, CA) y se transformaron en *E. coli* químicamente competente con TOP10 (Invitrogen, CA). La PCR de la colonia se realizó en los transformantes para identificar los clones que contenían el inserto. El ADN del plásmido se aisló a partir de clones que contenían inserto, usando un kit de QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). Los insertos en los plásmidos fueron secuenciados en ambas cadenas para determinar las secuencias de ADN de cadena ligera variable o pesada variable utilizando cebadores M13 inversos y directos (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Las secuencias de la cadena pesada variable y ligera variable de los anticuerpos monoclonales 7F9, 11E6 y 4E5 y sus tres CDRs de cadena pesada variable y tres CDRs de cadena ligera variable se enumeran en la Tabla 4, arriba.

1.3. Construcción y expresión de anticuerpos recombinantes anti RAGE humano

El ADN que codificaba la región constante de la cadena pesada de anticuerpos monoclonales murinos anti-RAGE humano 7F9, 11E6 y 4E5 se sustituyó por un fragmento de ADNc que codificaba la región constante de IgG1 humana mediante recombinación homóloga en bacterias. La región constante de la cadena ligera de cada uno de estos anticuerpos fue sustituida por una región constante kappa humana (Tabla 1, más arriba). Los anticuerpos quiméricos de longitud completa se expresaron transitoriamente en células COS o células 293 mediante cotransfección de los ADNc de las cadenas pesada y ligera quiméricas, ligados en el plásmido de expresión pBOS o pTT3 (Mizushima y Nagata, Nucleic Acids Research 1990, vol 18, pág 5322). El material sobrenadante celular que contenía el anticuerpo quimérico recombinante se purificó por cromatografía de proteína A Sefarosa y el anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de tampón ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se dializaron en PBS.

1.4. Unión mediante ELISA de AcMos recombinantes anti-RAGE humano y AcMos anti-RAGE humano obtenidos a partir de hibridomas.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-RAGE humano purificados se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para unirse a RAGE humano en un ELISA competitivo. Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-RAGE humano recombinantes o los anticuerpos monoclonales anti-RAGE humano obtenidos a partir de hibridomas se diluyeron en PBST + 10% de Superblock (Pierce Biotech, Rockford, IL) y se prepararon como una solución madre 2x con varias concentraciones en el intervalo desde 320 µg/ml hasta 0,0156 µg/ml (7F9 y 11E6) y desde 160 µg/ml hasta 0,0078 µg/ml (4E5). Los anticuerpos monoclonales anti-RAGE humano biotinilado, obtenidos a partir de hibridomas (7F9-biotina, 11E6-biotina y 4E5-biotina) se prepararon a 8 µg/ml en PBST + 10% de Superblock. Se mezclaron volúmenes iguales (50 µL) de cada anticuerpo monoclonal anti-RAGE humano recombinante quimérico o anticuerpo monoclonal anti-RAGE humano recombinante obtenido a partir de hibridomas y cada AcMo anti-RAGE biotinilado obtenido a partir de hibridomas correspondiente. A continuación se añadieron 50 µL de esta mezcla a placas de ELISA recubiertas previamente con RAGE humano recombinante a 2 µg/ml y se incubaron durante 1,5

horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS + 0,05% de Tween-20. HRP estreptavidina se diluyó (1 mg/ml) 1:16000 en PBST + 10% de Superblock; se añadieron 50 µL/pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS + 0,05% de Tween-20. Se añadieron a cada pocillo 50 µL de solución TMB (Sigma, St Louis, MO) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo 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)

La proteína recombinante husRAGE, 293/6.1 sRAGE His 6 se expresó y se purificó en células HEK293 (ATCC CRL-1573). El vector de expresión utilizado para la generación de la expresión estable era "pcDNA3 (-) 6.1 C HIS A".

Las técnicas convencionales de biología molecular se utilizaron de acuerdo con Sambrook y Russel (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001). El ARN total procedente de linfocitos humanos (PBL) se transcribió de forma inversa en ADNc utilizando el sistema SuperScript RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad EE.UU.). 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), el ADNc de RAGE se amplificó a partir del ADNc (obtenido anteriormente), proporcionando el ADNc de RAGE como se describe en la secuencia de referencia NM-001136. El fragmento de PCR migró en un gel de agarosa, se purificó y se extrajo con el kit de extracción en gel de QIAquick (Qiagen GmbH, Alemania). Después, el ADNc se cortó con las endonucleasas de restricción EcoR1 y XhoI. El fragmento resultante se purificó en gel y se ligó en el vector pcDNA 3 (Invitrogen, EE.UU.) que se había cortado previamente con XhoI/EcoR1. Después de la transformación en células de *E. coli* XL-1 blue (Invitrogen, EE.UU.) se identificó un clon recombinante positivo. La secuencia de este clon se verificó y el ADN del plásmido pcDNA3/RAGE 2.6 se aisló utilizando el plásmido mini-Kit (Qiagen, Alemania). La región que codificaba la parte extracelular de RAGE, husRAGE, se amplificó a partir de pcDNA3/RAGE 2.6 usando PCR y los cebadores N-SE A: AGT AAC GGC CGC CAG TGT GCT GGA ATT CGG A (SEQ ID NO: 83) y C-SE B: CCG GTA CCA CCT GCA GTT GGC CCC TCC TCG CC (SEQ ID NO: 84). El producto de la PCR resultante se cortó con las endonucleasas de restricción EcoR1 y Kpn1, se purificó en gel como se ha descrito anteriormente y se ligó en "pcDNA3.1 (-) Myc HIS" (Invitrogen, EE.UU.), que se había cortado previamente con EcoR1/Kpn1. El plásmido resultante "pcDNA 3 (-) 6.1 C HIS A" se transfectó en células HEK293 utilizando Superfect (Qiagen, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La selección de células resistentes se realizó utilizando 800 µg/ml de G418 en medio MEM (nº M4528, Sigma, Alemania) + 10% de FCS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina/estreptavidina (Invitrogen, EE.UU.). La clonación de células individuales a través de diluciones en serie de suspensiones celulares condujo a la identificación de un clon "293/6.1 sRAGE His 6" que secretaba husRAGE en el medio de cultivo celular, como se confirmó mediante transferencia Western, usando un anticuerpo específico de RAGE (Santa Cruz; nº sc5563). Para la expresión y la purificación de cantidades suficientes de proteína husRAGE, este clon se cultivó en suero que contenía medio de cultivo celular (véase más arriba) en centros de cultivo de células (cell factories, Nunc, Alemania). Después las células se cambiaron a un medio exento de suero Pro293a-CDM (nº 12-764Q, Bio Whittaker, Bélgica) y se incubaron durante 3 días a 37°C. Se recogieron 80 litros de medio exento de células y se concentró usando columnas Hemoflow F-Series High-Flux (Fresenius Medical Care AG, Alemania) hasta un volumen de 1400 ml.

La purificación de proteínas se realizó utilizando cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) mediante Diarect AG (Freiburg, Alemania) y sefrosa FF para la quelación (Amersham-Bioscience, Suecia). El equilibrado de la columna y la unión de hexa-His que contenía proteína procedente de material sobrenadante de las células a la matriz, se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La elución de la proteína se realizó utilizando gradientes por etapas con concentraciones crecientes de imidazol. Las fracciones eluidas se analizaron en busca de proteína que contenía hexa-His utilizando transferencias Western y anticuerpos anti-HIS. husRAGE purificado eluía específicamente a 250-500 mM de imidazol. Las fracciones positivas se combinaron, se concentraron y se dializaron 3 veces frente a PBS (2 x 4 h, 1 x 16 h).

Una versión más corta en el extremo N-terminal de husRAGE (102-331-sRAGE-HIS) que había perdido los primeros 101 aminoácidos de RAGE humano, se generó mediante técnicas convencionales de biología molecular, como se ha descrito anteriormente para la proteína husRAGE. Esta proteína se generó por el mismo procedimiento básico utilizado para husRAGE (1-331). Utilizando el plásmido descrito anteriormente (pcDNA3/RAGE 2.6) y dos cebadores (CGA AGC TTG ATG AAC AGG AAT GGA AAG GAG ACC AAG (SEQ ID NO: 85) y TCC TCG AGC ACC TGC AGT TGG CCC CTC CTC GCC T (SEQ ID NO: 86)), la versión más corta del ADN de husRAGE se amplificó por PCR. Después del gel de agarosa y la elución del fragmento, el fragmento puro resultante se escindió con las endonucleasas de restricción HindIII y XhoI y se purificó de nuevo usando gel de agarosa y elución. El fragmento se ligó en psecTAG 2A (Invitrogen, EE.UU.), que se había cortado previamente con las endonucleasas de restricción HindIII y XhoI. Después de la transformación en células de *E. coli* "TOP10 One Shot" (Invitrogen, EE.UU.) se escogió un clon positivo y se aisló el ADN plasmídico. El ADN en el vector de expresión se transfectó en células HEK293 F utilizando el sistema de expresión Freestyle (Invitrogen, EE.UU.). Después de 96 horas de expresión, se utilizó el material sobrenadante exento de células para la purificación utilizando perlas Ni-NTA Superflow (Quiagen, Alemania). El equilibrado y la unión se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína unida se eluyó en tampón (PBS, NaCl 160 mM, imidazol 150 mM, pH 8,0). Las fracciones que contenían proteína se

combinaron y se dializaron durante la noche a 4°C frente a TBS (solución salina tamponada con Tris; pH 7,4). Las concentraciones de HusRAGE purificado (102-331) se determinaron espectrofotométricamente.

Una versión más corta en el extremo C-terminal de la proteína de fusión husRAGE (1-130-sRAGE-Fc) que había perdido los aminoácidos después del aminoácido 130 de RAGE humano, se generó mediante técnicas convencionales de biología molecular como se ha descrito anteriormente para la proteína husRAGE. Utilizando el plásmido descrito anteriormente (pcDNA3/RAGE 2.6) y dos cebadores (GCACCATGGCAGCCGGAACAGCAGTTG (SEQ ID NO: 87) y GAGTCTCGAGGCAGAATCTACAATTTCTG (SEQ ID NO: 88)), la versión más corta del ADN para husRAGE se amplificó por PCR. Después del gel de agarosa y la elución del fragmento, el fragmento puro resultante se escindió con las endonucleasas de restricción NcoI y XhoI y se purificó de nuevo usando gel de agarosa y elución. El fragmento se ligó después en el plásmido pENTR4 que se había cortado previamente con las endonucleasas de restricción NcoI y XhoI. Las mezclas de ligación se transformaron en células de *E. coli* "TOP10 One Shot" (Invitrogen, USA) para generar pENTR4-RAGE 1-130. Se escogió un clon positivo y se aisló el ADN plasmídico. Con el uso de recombinación específica del sitio y el sistema de clonación de puerta de enlace (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU., attL x attR) con ADN del clon pENTR4 hRAGE 1-130 y el ADN del vector pcDNA3.1(+)-Zeo hlgG lambda hc 257-Stop, se construyó un plásmido (véase más adelante) que después de la transformación en células "TOP10 One Shot" (Invitrogen, EE.UU.) y la 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 la purificación de la proteína resultante a partir del material sobrenadante celular usando perlas de proteína G (Ejemplo 2.2), dio lugar a una proteína con >95% de pureza.

Ejemplo 3: Construcción de pcDNA3.1(+)-Zeo hlgG lambda hc 257-Stop

Se emplearon 2 cebadores de oligonucleótidos (gtacgatatcgaggacgaatggatccaccgtgccagcacc (SEQ ID NO: 91); ctagtctagatcattaccggagacagggag (SEQ ID NO: 92)) para amplificar la secuencia de ADN de la cadena pesada de hlgG lambda procedente de una genoteca de ADNc de placenta humana (Clontech n° HL5014a) utilizando la polimerasa EasyA en una reacción en cadena de la polimerasa, PCR. El ADN resultante se purificó en gel (como se ha descrito arriba), se clonó en el vector pcDNA3.1 V5-His TOPO (kit de expresión en pcDNA3.1/V5/His TOPO TA Invitrogen n° K4800-01) usando las instrucciones del fabricante y se transformó en células de *E. coli* TOP10, como se ha descrito anteriormente. Se identificaron los clones positivos y se purificó el ADN plasmídico resultante (denominado: pcDNA3.1(V5His) FC/hlgG lambda hc Nr.2/7) usando PCR y cebadores de oligonucleótidos (gtacgatatcgaggacgaatggatccaccgtgccagcacc (SEQ ID NO: 93); ctagtctagatcattaccggagacagggag (SEQ ID NO: 94)). La parte hlgG lambda hc del ADN se amplificó, se cortó con EcoRV/XbaI, se ligó al ADN del vector pcDNA3.1(+)-Zeo cortado previamente con EcoRV/XbaI y se transformó en células de *E. coli* TOP10. El plásmido resultante se denominó: pcDNA3.1(+)-Zeo hlgG lambda hc 257-Stop y se utilizó en el trabajo posterior para expresar proteínas fusionadas por el extremo N-terminal en marco con una parte C-terminal de las cadenas pesadas de inmunoglobulina IgG.

3.1. Transfección y expresión de proteínas en células HEK293F

Las células HEK 293F que se habían cultivado durante 2 - 3 días en medio de expresión Free Style 293, se centrifugaron a 400 g y se retiró el material sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en medio y se ajustó a 3×10^7 células en 28 ml de medio de nuevo aporte, se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se incubó en una incubadora a 37°C, 8% de CO₂ en un agitador orbital a 150 rpm hasta que se estableció la mezcla de transfección.

Las mezclas de transfección con el complejo 293fectin-ADN se establecieron del modo siguiente:

- (i) 30 µg de ADN se diluyeron con Opti-MEM I hasta un volumen total de 1000 µl (control 1000 µl de Opti-MEM I) y se mezclaron.
- (ii) 35 µl de 293fectin (Invitrogen n° 12347-019; 1 ml); se diluyeron con Opti-MEM I hasta un volumen total de 1000 µl, se mezclaron y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente.

La mezcla de ADN y la solución de 293fectin de (i) y (ii) se transfirió a un nuevo tubo, se mezcló ligeramente y después de la incubación durante 25 minutos a temperatura ambiente, se añadió a las células en el Erlenmeyer.

Las células se incubaron con esta mezcla de transfección durante el tiempo indicado en una incubadora a 37°C, 8% de CO₂ en un agitador orbital a 150 rpm. El material sobrenadante celular se recogió por centrifugación a 400 g durante 10 minutos.

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

Para acoplar la proteína del material sobrenadante de las células a las perlas, las perlas (proteína G-Sefarosa 4 Fast Flow (Amersham Bioscience) se lavaron 3 veces en PBS mediante la suspensión de las perlas en PBS y centrifugación a 13.500 rpm, retirando el material sobrenadante. Las perlas se incubaron con los respectivos materiales sobrenadantes de las células (300 ml de material sobrenadante celular por ml de perlas) para acoplarlas

durante 1 - 2 horas en un rotador a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el material sobrenadante de las células durante 12 horas o toda la noche a 4°C. Después de la incubación, las perlas se lavaron 3 veces con PBS como se ha descrito anteriormente. La proteína unida se eluyó mediante la adición de 200 µl de NaCl 140 mM + glicina 0,1 M al sedimento de perlas e incubando durante 30 minutos en un rotador. Después de la centrifugación, el material sobrenadante se neutralizó inmediatamente mediante la adición de Tris 2 M para ajustar el pH a 7,1 - pH 7,4. El sedimento de perlas se retiró. Las sondas obtenidas se dializaron frente a PBS y se almacenaron congeladas en partes alícuotas a -20°C. La proteína de fusión RAGE-Fc que contenía el ectodominio extracelular completo de RAGE, se obtuvo a partir de R&D Systems (nº 1145-RG; quimera de RAGE humano recombinante/Fc).

5
10 3.3. Unión mediante transferencia de puntos de anticuerpos a péptidos o fragmentos de RAGE en una forma no desnaturalizada.

Las transferencias de puntos se utilizaron para evaluar la unión de anticuerpos a péptidos o a fragmentos de RAGE en una forma no desnaturalizada. Las proteínas utilizadas eran sRAGE-Proteína (1-331 sRAGE-HIS) o una versión más corta en el extremo N-terminal (102-331-sRAGE-HIS). Los péptidos se ordenaron y sintetizaron mediante Biotrend de acuerdo con métodos convencionales (síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador AMS 222 usando química de Fmoc/tBu) que contenían un extremo carboxilo terminal libre. Los péptidos se purificaron por HPLC y el análisis de cada péptido para estudiar la pureza se realizó utilizando RP-HPLC. Todos los péptidos tenían una pureza >80%. Las identidades de los péptidos se verificaron mediante espectrometría de masas.

15
20 Los péptidos utilizados eran 30 meros que incluían la región extracelular de la proteína RAGE humana. La carga neta de la mayoría de los péptidos era similar.

NtermR31:	QNITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLEWKLN
	carga neta: 7 (SEQ ID NO: 70)
Péptido 1:	KLNTGRTEAWKVLSPQGGGPWDSVARVLPN
	carga neta: 2 (SEQ ID NO: 71)
Péptido 2:	LPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAMNRNGKE
	carga neta: 0 (SEQ ID NO: 72)
Péptido 3:	GKETKSNYRVRVYQIPGKPEIVDSASELTA
	carga neta: 1 (SEQ ID NO: 73)
Péptido 4:	LTAGVPNKVGTVCVSEGSYPAGTLSWKLDGK
	carga neta: 1 (SEQ ID NO: 74)
Péptido 5:	DGKPLVPNEKGVSVKEQTRRHQPETGLFTLQ
	carga neta: 2 (SEQ ID NO: 75)
Péptido 6:	TLQSELMVTPARGGDRPTFSCSFSPGLPR
	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:	DQGTYSVCVATHSSHGPQESRAVSISIIIEPG
	carga neta: -1 (SEQ ID NO: 80)

25 Los puntos que consistían 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 observaron como manchas sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham, RPN68D) por duplicado. Las membranas se secaron y la unión no específica fue bloqueada mediante agitación de las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con reactivo de bloqueo de Western (Roche, nº 1921673). Se retiró 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, ML37-4E5, disponibles comercialmente en R&D Systems (por ejemplo, AF1145). Las transferencias se lavaron cuatro veces (cada vez 5 minutos de incubación con agitación a temperatura ambiente) con 1 x PBS. Las transferencias se incubaron después con anticuerpo secundario AP de cabra anti-IgG de ratón (Sigma nº A-7434) diluido 1:2000 en reactivo de bloqueo de Western (Roche, nº 192173.). La incubación durante 1 hora fue como anteriormente (agitación, temperatura ambiente). Los filtros se lavaron 4 veces (5 minutos cada uno) en 1 X PBS. El desarrollo de las señales se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con solución de sustrato NBT/BCIP (Roche, nº 1697471). El desarrollo de color se detuvo después de 10 minutos con agua bidestilada. Véase la Figura 2.

Aunque husRAGE se había detectado en transferencias de puntos con los tres anticuerpos monoclonales de la presente invención y con el anticuerpo policlonal AF1145 (de una fuente comercial, R&D), ninguno de los péptidos fue detectado por los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Sin embargo, el anticuerpo policlonal detectó varios péptidos. El Péptido 9, que incluía la secuencia de aminoácidos utilizada para generar anticuerpos policlonales tal como describen Ostendorp et al. (EMBOJ. 26, 3875, 2007), se detectó claramente con el anticuerpo policlonal disponible comercialmente. Estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales de la presente invención reconocen claramente un epítipo diferente del que reconocen los anticuerpos disponibles actualmente.

Una caracterización adicional de la unión se realizó mediante el análisis de mutantes RAGE de sRAGE humano expresados en *E. coli*. Los anticuerpos monoclonales 11E6 y 4E5 se unen a una región alrededor del dominio C2, ya que la unión se pierde en los mutantes por delección, que carecen de los aminoácidos 235-336 y la unión es evidente en la proteína RAGE mutante que consiste en los aminoácidos 235-336.

Ejemplo 4: Interacción entre el globulómero A β 1-42 y la proteína obtenida a partir de husRAGE utilizando tecnología HTRF.

El ensayo se basa en HTRF (fluorescencia con resolución temporal homogénea), tecnología disponible en CIS Bio International (Bagnols, Francia),

Los componentes donantes y aceptores de HTRF, anti-6HIS-criptato de europio (catálogo CIS Bio nº: 61HISKLA; 500 pocillos/13 μ g) y estreptavidina XL - 665 (catálogo CIS Bio nº: 611SAXLA, 500 pocillos/250 μ g), se disolvieron cada uno en 250 μ l de agua bidestilada. Estas soluciones madre se diluyeron 100 veces en PBS, 0,1% de BSA, pH 7,4 para obtener soluciones de trabajo con concentraciones finales de Anti6His-criptato 3,7 nM y estreptavidina XL-665 60,6 nM. Soluciones de 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,625 μ M, 312,5 nM, 156,25 nM del globulómero A β biotinilado (1/5 de péptido A β 1-42 usado para preparar los globulómeros A β era proteína biotinil- β -amiloide (1-42) (Bachem nº H-5642) se prepararon de acuerdo con Barghorn et al. (J. Neurochemistry, vol. 95, nº 3, págs. 834-847, 2005 y el documento WO/2007/062852; solicitud internacional nº PCT/EP2006/011530); la concentración de globulómero utilizada se calculó basándose en la concentración de monómeros A β 1-42, que se utilizaron para la generación de los globulómeros. Soluciones de 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,625 μ M, 0,312 μ M, 0,156 μ M del globulómero A β biotinilado se prepararon en el mismo tampón (PBS, 0,1% de 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 1 μ M y la solución se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, seguido de la adición de 4 μ l de cada una de las soluciones (Anti6His-criptato 3,7 nM y estreptavidina XL-665 60,6 nM).

El ensayo se incubó durante 2 horas a 4°C. Después de la adición de 4 μ l de una solución madre KF 2 M, se midió la señal de HTRF en modo HTRF en un instrumento de fluorescencia BMG Pherastar (BMG Labtech GmbH, Alemania). Se emplearon curvas de señal máxima sin resultados de anticuerpos y de ruido de fondo, utilizando solamente solución de Anti6HIS-criptato o de estreptavidina XL. Los valores del % de DeltaF se calcularon de acuerdo con las instrucciones del fabricante CisBio, utilizando GraphPad Prism 4 (programa informático GraphPad, San Diego, EE.UU.).

Ejemplo 5: Inhibición de la unión del globulómero A β 1-42 a husRAGE mediante anticuerpos que utilizan la tecnología HTRF

El protocolo básico tal como el descrito anteriormente, fue utilizado con algunas modificaciones. Los componentes donantes y aceptores de HTRF se diluyeron 40 veces hasta 10,25 nM para anti-6HIS-criptato de europio y 151,5 nM para estreptavidina XL-665 en PBS, pH 7,4, 0,1% de BSA.

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales purificados (AcMos) contra husRAGE o inmunoglobulinas de control (IgG1 de ratón e IgG2a de ratón; nº M-5284 resp. nº M-5409; Sigma, Alemania) como anticuerpos de control.

El ensayo se realizó en un volumen total de 20 μ l en placas de 384 pocillos. Para cada punto del ensayo: se incubaron 4 μ l de husRAGE 1 μ M con 4 μ l de anticuerpo de la prueba o los anticuerpos de control IgG 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 temperatura ambiente. El control para el ruido de fondo se realizó sin husRAGE y sin anticuerpos. Se obtuvo una señal máxima sin anticuerpos. Posteriormente, se añadieron 4 μ l de globulómero A β biotinilado 800 nM, así como 2 μ l de 10,25 nM para Anti-6HIS-criptato de europio y 151,5 nM para estreptavidina XL-665. Las diferencias en el volumen se ajustaron mediante la adición de tampón de unión (1 x PBS pH 7,4; 0,1% de BSA). El ensayo se incubó durante otra hora. Después de la adición de 4 μ l de una solución madre de KF 2 M, se midió la

señal de HTRF en modo HTRF en un instrumento de fluorescencia BMG Pherastar (BMG Labtech GmbH, Alemania). Se emplearon curvas de señal máxima sin resultados de anticuerpos y de ruido de fondo, utilizando solamente solución de anti-6HIS-criptato o estreptavidina XL. Los valores del % de Delta F se calcularon de acuerdo con las instrucciones del fabricante CisBio, utilizando GraphPad Prism 4 (programa informático GraphPad, San Diego, EE.UU.). Los resultados se muestran 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.

Como se muestra en la figura 4, husRAGE que expresaba los tres dominios de RAGE, se unía a globulómeros A β amiloides. Una proteína mutante de RAGE que consistía en sRAGE humano que carecía de la mayor parte del dominio v (RAGE102-331) se unía con mayor afinidad a los globulómeros A β amiloides, lo que indica que el dominio dentro de RAGE humano para la unión a globulómeros A β está dentro del extremo C-terminal.

Ejemplo 6: Unión de globulómeros A β a proteínas RAGE utilizando la tecnología del ensayo de selección ALPHA

Este ensayo se realizó en tampón de ensayo (HEPES 25 mM, NaCl 100 mM pH 7,4 y 0,1% de BSA) en un volumen de 20 μ l. Las perlas donantes utilizadas se recubrieron con estreptavidina (Perkin Elmer; 6760002S) y las perlasceptoras utilizadas eran Proteína A ALPHALISA (Perkin Elmer; CUSM64133000EA), 4 μ l de cada una de las perlas se diluyó previamente en 196 μ l de tampón de ensayo.

Empleando una placa de 384 pocillos Proxi-Plate (Perkin Elmer, n° 6006280), se cargaron perlas donantes con biotina-globulómeros A β (véase más arriba) usando 4 μ l de las perlas donantes diluidas previamente y 6 μ l de una solución 200 nM de globulómeros A β biotinilados.

Las perlasceptoras se cargaron con diferentes cantidades de proteínas de fusión RAGE-Fc usando 4 μ l de las perlasceptoras diluidas previamente y 6 μ l de diferentes diluciones de proteínas de fusión RAGE-Fc (partiendo, por ejemplo, de 100 μ g/ml).

La carga (unión de las proteínas a las perlas) se llevó a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos.

La unión de globulómeros A β a RAGE comenzó mediante la combinación de las preparaciones de perlas donantes yceptoras cargadas previamente durante 180 minutos adicionales en la oscuridad. Las señales se midieron en un instrumento ALPHA-Quest (Perkin Elmer) con un tiempo de retardo de 1 segundo. Otros análisis se realizaron utilizando el programa informático GraphPadPrism. En un experimento diferente, pero utilizando la misma tecnología, la unión de globulómeros A β a RAGE-Fc que consistía en los tres dominios, se comparó con la unión de globulómeros A β a la proteína mutante RAGE-Fc que consistía en el dominio v solamente (aminoácidos 1-130 de huRAGE). Como se muestra en la figura 5, la unión de globulómeros A β amiloides a los tres dominios de RAGE soluble era fuerte y la unión de globulómeros A β amiloides al dominio v de RAGE era insignificante. Puesto que la unión de globulómeros A β a RAGE tiene lugar en la región C-terminal, se estimó que los anticuerpos que se unían preferiblemente a estos dominios competían con esta unión.

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

7.1. Preparación de las estructuras artificiales

Las estructuras artificiales de E. coli RAGE enumeradas en la Tabla 6 se generaron de la siguiente manera. La estructura artificial 1 fue creada mediante amplificación con PCR del plásmido molde pcDNA 3 (-) 6,1 C HIS A, usando el cebador directo (atgctacatatgaaaagacagctatcgcgattgcagtgccactggctggtttcgtaccgtagcgcaggccgctcaaaacatcacagcc (SEQ ID NO: 89)) y el cebador inverso (atgctactcgagtcagtggtggtgg tgggtggtgagttcccagccctgatcctcccacagagcctgcagttggccctcc (SEQ ID NO: 90)) que introducían los sitios de restricción Nde I y Xho I para la subclonación en los sitios análogos de pET29. Las estructuras artificiales restantes (n° 2 - n° 7, Tabla 6) se generaron utilizando la estructura artificial 1 como molde. Las secuencias que codificaban los residuos de aminoácidos de RAGE 24-129, 24-234, 24-336, 130-234, 130-336, 235-336 se amplificaron con PCR a partir de la estructura artificial 1. Los fragmentos de ADN resultantes migraron en un gel de agarosa al 1,0% y el ADN se purificó utilizando el kit de extracción en gel QIAquick de Qiagen. Los fragmentos de ADN se digirieron con NdeI y XhoI y se ligaron en pET28a digerido de manera similar. La mezcla de ligación se transformó en células competentes Max Efficiency DH5a y se sembraron en placas de agar LB que contenían 50 mg/L de kanamicina. Después de incubar durante una noche a 37°C, tres colonias para cada clon se inocularon en 3 ml de caldo LB que contenía 50 mg/l de kanamicina y se agitaron durante una noche a 37°C. El ADN se aisló utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen y el inserto se secuenció utilizando el promotor T7 y cebadores específicos del terminador T7. La secuencia de ADN de los plásmidos que codificaban las estructuras artificiales n° 1 - n° 7 se especifican como SEQ ID NOs: 27 a 33 y las regiones traducidas correspondientes se enumeran como SEQ ID NOs 34-40.

Tabla 6: Estructuras artificiales de RAGE

Estructura artificial nº	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 de *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con el ADN plasmídico de la estructura artificial nº 1, se sembró en placas LB que contenían kanamicina (50 mg/L) y se incubó a 37°C durante una noche. Al día siguiente, 14 matraces Fernbach, conteniendo cada uno 1 litro de medio Terrific con kanamicina (50 mg/L), fueron inoculados con una UFC y se colocaron con agitación (180 rpm) en una incubadora a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600 nm} de 0,47, los matraces se transfirieron a una incubadora a 30°C (todavía con agitación a 180 rpm) y la expresión se indujo mediante la adición de IPTG 0,4 mM. Las células se recogieron 4 horas después de la inducción mediante centrifugación (15.900 g, 8 minutos, 4°C) y la pasta celular se congeló a continuación a -80°C hasta la purificación.

La purificación de la estructura artificial nº 1 de RAGE se llevó a cabo descongelando primero y resuspendiendo un sedimento celular ~20 g en 180 ml de tampón de lisis [Tris 50 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, 10% de glicerol, 0,1% de Triton X-100, MgCl₂ 0,5 mM, imidazol 20 mM, 1X inhibidores de proteasa exentos de EDTA de Roche, 20 U/ml de ADNasa I]. Las células se lisaron haciendo pasar la suspensión tres veces consecutivas a través de un microfluidizador Avestin Emulsiflex a 3°C. Después, el lisado clarificado se cargó en una columna HiTrap IMAC de 5 ml (GE Healthcare, 17-5255-01) a 2 ml/min. A continuación, la columna se lavó con 10 VC de tampón de lavado [Tris 50 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, 10% de glicerol, imidazol 20 mM]. Después de la etapa de lavado, RAGE se eluyó en gradiente usando tampón de elución [Tris 50 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, 10% de glicerol, imidazol 500 mM]. Las fracciones que contenían RAGE se agruparon y después se dializaron frente a Tris 50 mM pH 7,6, NaCl 20 mM, 10% de glicerol. El análisis por espectrometría de masas del material purificado confirmó que el líder OmpA había sido procesado y que el material purificado comenzaba con el residuo 23 de RAGE (es decir, la secuencia A-Q-N-...) tal y como se esperaba.

Los plásmidos que codificaban las estructuras artificiales nº 2- nº 7 se transformaron por separado en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), se sembraron 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 µL de medio Overnight Express Instant TB (Novagen) con una colonia y se agitó durante 19 horas a 30°C. Las células se sedimentaron por centrifugación (15.900 x g, 10 minutos, 4°C) y luego se congelaron a -80°C. Los gránulos (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% de Triton X-100, 10% de glicerol, 0,2 mg/ml de lisozima, 1 ml de mezcla inhibidora de proteasa III (Calbiochem), 20 U/ml de benzonasa, B-mercaptoetanol 5 mM]. Los lisados se sometieron a ultrasonidos en un aparato de ultrasonidos Vibra Cell durante 2 minutos, seguido de centrifugación a 20K x g durante 30 minutos. Las columnas Econo-Pac 10 de Bio-Rad se cargaron con un volumen de lecho de 2 ml de resina ProBond Nickel y se equilibraron con tampón de lisis. Los lisados aclarados se hicieron pasar a través de las columnas 3 veces consecutivas, seguido de lavado con 3 x 10 volúmenes de columna (60 ml total) de tampón de lavado [2X PBS, imidazol 20 mM, 10% de glicerol, B-mercaptoetanol 5 mM]. Las proteínas eluyeron de las columnas con un volumen de columna 5 x 1 (10 ml total) de tampón de elución [2X PBS, imidazol 500 mM, 10% de glicerol, B-mercaptoetanol 5 mM]. El material eluido se transfirió a PBS, 10% de glicerol y DTT 1 mM usando columnas Econo-Pac 10DG de Bio-Rad.

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

Los medios utilizados para la expansión celular de hibridomas consistían en medio "BD Cell MAb Quantum Yield" (Becton Dickinson - nº de catálogo 220511) que contenía 10% de suero fetal bovino con IgG ultra reducida (Invitrogen - nº de catálogo 16250-078). Brevemente, múltiples cultivos iniciadores de 300 ml de la línea celular de hibridoma murino que expresaba el anticuerpo monoclonal 11E6 de RAGE, se expandieron en una botella de cultivo rotatoria de 2 L con agitación en una incubadora (65 rpm, 8% de CO₂, 37°C) hasta alcanzar una densidad de 1,0 x 10⁶ células/ml. Las células se sembraron después en 20 L de medio con una densidad de 0,06 x 10⁶ células/ml en

un biorreactor Wave de 25L con ajustes operativos de 14 sacudidas/minuto, un ángulo de sacudida de 6°, temperatura de 37°C y una tasa de burbujeo de CO₂ al 8% de 0,15 Lpm. Después de dos días, el cultivo se expandió adicionalmente mediante la adición de medio hasta tener un volumen final de 24 L, lo que dio como resultado una nueva densidad celular de 0,43 x 10⁶ células/ml. El cultivo se recogió 12 días después de haber sido
 5 expandido hasta un volumen total. Las células se eliminaron por centrifugación continua (Carr ViaFuge, 6000 rpm, 1,7 Lpm). Después de la adición de NaN₃ 5 mM (desde una solución madre de NaN₃ 1 M - Hampton Research) a los medios aclarados, el material se empleó inmediatamente en el proceso de purificación.

Los medios utilizados para la expansión celular de hibridomas consistían en medio BD Cell MAb Quantum Yield (Becton Dickinson - nº de catálogo 220511) que contenía 10% de suero fetal bovino con IgG ultra reducida (Invitrogen - nº de catálogo 16250-078). Brevemente, múltiples cultivos iniciales de 300 ml de la línea celular de
 10 hibridoma murino que expresaba el anticuerpo monoclonal 4E5 de RAGE, se expandieron en una botella de cultivo rotatoria de 2 L con agitación en una incubadora (65 rpm, 8% de CO₂, 37°C) hasta alcanzar una densidad de 1,0 x 10⁶ células/ml. Las células se sembraron después en 5 L de medio con una densidad de 0,12 x 10⁶ células/ml en un biorreactor Wave de 25L con ajustes operativos de 12 sacudidas/minuto, un ángulo de sacudida de 6°, temperatura
 15 de 37°C y una tasa de burbujeo de CO₂ al 8% de 0,15 Lpm. Después de cuatro días, el cultivo se expandió adicionalmente mediante la adición de medio hasta tener un volumen final de 24 L, lo que dio como resultado una nueva densidad celular de 0,24 x 10⁶ células/ml. La tasa de sacudida se incrementó a 14 sacudidas/minuto. El cultivo se recogió 12 días después de haber sido expandido hasta un volumen total. Las células se eliminaron por
 20 centrifugación continua (Carr ViaFuge, 6000 rpm, 1,7 Lpm). Después de la adición de NaN₃ 5 mM (desde una solución madre de NaN₃ 1 M - Hampton Research) a los medios aclarados, el material se empleó inmediatamente en el proceso de purificación.

Los medios utilizados para la expansión celular de hibridomas consistían en medio BD Cell MAb Quantum Yield (Becton Dickinson - nº de catálogo 220511) que contenía 10% de suero fetal bovino con IgG ultra reducida (Invitrogen - nº de catálogo 16250-078). Brevemente, múltiples cultivos iniciadores de 300 ml de la línea celular de
 25 hibridoma murino que expresaba el anticuerpo monoclonal 7F9 de RAGE, se expandieron en una botella de cultivo rotatoria de 2 L con agitación en una incubadora (65 rpm, 8% de CO₂, 37°C) hasta alcanzar una densidad de 1,0 x 10⁶ células/ml. Las células se sembraron después en 10 L de medio con una densidad de 0,05 x 10⁶ células/ml en un biorreactor Wave de 25L con ajustes operativos de 12 sacudidas/minuto, un ángulo de sacudida de 6°, temperatura
 30 de 37°C y una tasa de burbujeo de CO₂ al 8% de 0,15 Lpm. Después de cuatro días, el cultivo se expandió adicionalmente mediante la adición de medio hasta tener un volumen final de 25 L, lo que dio como resultado una nueva densidad celular de 0,25 x 10⁶ células/ml. La tasa de sacudida se incrementó a 14 sacudidas/minuto. El cultivo se recogió 10 días después de haber sido expandido hasta un volumen total. Las células se eliminaron por centrifugación continua (Carr ViaFuge, 6000 rpm, 1,7 Lpm). Después de la adición de NaN₃
 35 5 mM (desde una solución madre de NaN₃ 1 M - Hampton Research) a los medios aclarados, el material se empleó inmediatamente en el proceso de purificación.

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

Al medio de cultivo de hibridoma aclarado, se añadió glicina y NaCl hasta tener concentraciones finales de 3 M y 1,5 M, respectivamente. El pH se ajustó a 8,0 con NaOH. El material se filtró usando un filtro de membrana de 5 µm Pall Capsule nº 120 y se cargó sobre una columna de proteína A de 200 ml de BioSeptra. La solución de proteína se lavó
 40 con 11 VC de tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM pH 8,0, azida de sodio 1 mM) y se eluyó utilizando un gradiente por etapas de glicina 50 mM (pH 3,0). Las fracciones con un tamaño de 100 ml se recogieron y la concentración de proteína se determinó midiendo la A280 nm. Todas las etapas del procesamiento de la columna se realizaron a 4°C. El material reunido se dializó frente a 20 L de Tris 10 mM pH 8,0 durante una noche a 4°C. Un refinamiento cromatográfico adicional se logró utilizando un minicartucho Singlesep de intercambio aniónico básico
 45 fuerte Sartobind (Sartorius) en el modo de flujo a través a 10 ml/min. El anticuerpo no se une a la columna y se recoge como una mezcla. Después de esta etapa, el material se concentró hasta 5 mg/ml usando una celda de presión con agitación de Amicon (membrana 5000 MWCO, 5,17 bar, 4°C). Finalmente, el anticuerpo se dializó dos veces frente a 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. Experimentos de unión de ELISA:

Los antígenos (proteínas purificadas de las estructuras artificiales nº 1-7) se diluyeron en tampón de recubrimiento [NaHCO₃ 100 mM pH 8,2] hasta 1 µg/ml, y 100 µl de la solución resultante se dividió después en partes alícuotas en una placa de 96 pocillos Nunc Immuno Plate (Maxi-Sorb Surface, de fondo plano, nº de catálogo 439454). La placa se selló con película de sellado y se incubó a 4°C durante una noche. Al día siguiente, los pocillos de la placa se lavaron cada uno 3 veces con 150 µL de tampón PBST [Sigma PBS + 0,05% de Tween 20]. A continuación, 300 µl
 50 de solución de bloqueo (3% de NFDm en PBST) se añadió a cada pocillo. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación a 100 rpm. Después de la etapa de incubación, cada pocillo se lavó de nuevo tres veces con 150 µL de PBST. Cien µL del anticuerpo correspondiente que se iba a someter a ensayo (es decir, 7F9, 11E6 y 4E5) se añadieron a diferentes diluciones realizadas en PBST/0,5% de BSA. A continuación, la placa se selló con película de sellado y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación a 100 rpm. A continuación,
 55 la solución de anticuerpo se drenó fuera de los pocillos y cada pocillo se lavó tres veces con 200 µL de PBST. A cada pocillo se añadieron después 200 µL de una dilución 1:5000 (en PBST/1% de NFDm) de anticuerpo secundario
 60

conjugado [conjugado de burro anti-ratón y HRPO de Jackson Immuno Research, nº de catálogo 715-035-150]. La placa se cubrió y se permitió incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 100 rpm. Después de esta incubación, la solución se eliminó de los pocillos y cada pocillo se lavó tres veces con 200 µL de PBST. A cada pocillo se añadieron 100 µL de solución de sustrato HRPO [sustrato líquido de 3,3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB), supersensible para ELISA, nº de catálogo de Sigma T4444] y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, 50 µL de H₂SO₄ 2 M se añadieron a cada pocillo para detener la reacción y se midió la A_{540 nm} de cada pocillo usando un lector de placas de microtitulación.

Los resultados de estos experimentos de unión se muestran en las Figuras 6A, 6B y 6C y las Figuras 7A, 7B y 7C. Las Figuras 6A, 6B y 6C muestran que los residuos 24-234 de RAGE no estaban involucrados en la unión de los anticuerpos monoclonales de RAGE 11E6, 4E5 o 7F9. Por el contrario, como se muestra en las Figuras 7A, 7B y 7C, los residuos 235-336 de RAGE eran suficientes para unir los anticuerpos monoclonales de RAGE 11E6 y 4E5. El AcMo de RAGE 7F9 no mostraba ninguna unión a ninguno de estos fragmentos de RAGE (expresados en *E. coli*).

Ejemplo 8: Cartografiado de epítomos

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

Aproximadamente 20 mg de resina de flujo rápido de Sefarosa activada con CNBr se pesó en tres columnas de reacción compactas equipadas con fritas de 35 µm. Se permitió que las resinas se hincharan en 200 µL de HCl 1 mM antes de lavar 3 veces con 200 µL de HCl 1 mM. Las resinas se lavaron posteriormente 3 veces con 200 µL de tampón bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,3) que contenía cloruro de sodio 500 mM (tampón A). Una vez completadas, las soluciones se enjuagaron de las columnas de modo que solo se conservó una fina capa de tampón en la superficie de cada resina. Aproximadamente 5,5 nmoles de los anticuerpos se inmovilizaron a las resinas, lo que requería la adición de 235 µL de 7F9 (3,4 mg/ml), 500 µL de 11E6 (1,6 mg/ml) y 200 µL de 4E5 (3,75 mg/ml). Para las inmovilizaciones de los anticuerpos 7F9 y 4E5, también se incluyeron 200 µL de tampón A. Las columnas de reacción compactas se sellaron y se permitió mezclar mediante inversión a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez finalizado, las columnas de reacción compactas dejaron de estar selladas y se enjuagaron con tres adiciones de 200 µL de tampón A para eliminar el anticuerpo no unido. Después del enjuague, se añadieron 200 µL de un tampón que contenía Tris-HCl 100 mM (pH 8) y cloruro de sodio 500 mM (tampón B) a cada columna. Las columnas se volvieron a sellar y se permitió la mezcla mediante inversión a temperatura ambiente para bloquear los sitios no unidos pero activados en las resinas. Después de 2 horas, las columnas dejaron de estar selladas y se enjuagaron primero con 200 µL de tampón acetato de sodio 100 mM (pH 4) que contenía cloruro de sodio 500 mM (tampón C), seguido de 200 µL de tampón B. Este proceso se repitió dos veces más para asegurar la eliminación completa del anticuerpo no unido y para bloquear completamente los sitios de fijación restantes en las resinas. A continuación, las resinas se lavaron cuatro veces con 200 µL de tampón bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,3) que contenía cloruro de sodio 100 mM (tampón D) antes de acoplar el antígeno.

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

Se permitió que los antígenos sRAGE se unieran a las columnas de anticuerpos mediante la adición de 75 µL de antígeno expresado en *E. coli* a las resinas de 11E6 y 4E5 y la adición de 125 µL de antígeno expresado en *BacMam* a las resinas de 11E6, 4E5 y 7E9. Las columnas se sellaron y se permitió que las muestras se mezclaran por inversión a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de este tiempo, las columnas dejaron de estar selladas y se enjuagaron abundantemente con 4 adiciones de 200 µL de tampón D. Después de lavar con los enjuagues, las resinas se resuspendieron en 200 µL de tampón D, así como con las proteasas, generadas como soluciones 0,1 mg/ml de tripsina, endoproteinasa Glu-C o quimotripsina. Las cantidades de las proteasas variaron entre los experimentos para atenuar las digestiones, pero oscilaban entre 200-400 veces en exceso del antígeno sobre la proteasa en peso. Se permitió que la proteólisis tuviera lugar a temperatura ambiente mezclando por inversión durante 12 horas. Después de este tiempo, las columnas dejaron de estar selladas y la solución proteolítica se enjuagó y se guardó para su posterior análisis. Para las muestras sometidas a digestión doble, las resinas se resuspendieron en 200 µL de tampón D y una segunda proteasa antes de las etapas siguientes. Para aquellas muestras no tratadas con una segunda proteasa, las columnas se sometieron a dos lavados individuales de 200 µL en tampón D, seguidos de un lavado con 200 µL en tampón A, a continuación, un lavado final con 200 µL en tampón D. Cada lavado se guardó por separado para su posterior análisis. El epítipo que contenía los péptidos se eluyó de la columna con tres lavados individuales con 200 µL de ácido fórmico al 2%. Cada muestra de la elución se guardó por separado para su posterior análisis.

8.3. Análisis por espectrometría de masas de los péptidos que contiene epítomos

Las muestras se analizaron utilizando tanto un espectrómetro de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier Bruker Apex QE 7T (FT-ICR), así como un espectrómetro de masas Applied Biosystems Q-STAR Pulsar I. Para el análisis de espectrometría de masas por FT-ICR, se inyectaron 8 µL de las muestras de escisión de epítipo en una columna Jupiter C4 de fase inversa (0,5 x 150 mm, tamaño de partícula 5 µ, 300 Å de tamaño de poro) mediante una HPLC capilar Agilent series 1100. Las muestras se lavaron durante 5 minutos en 90% de agua con 0,1% de ácido fórmico (disolvente A) / 10% de acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico (disolvente B) con un caudal de 5 µL/min para desalar. Los péptidos se eluyeron en el espectrómetro de masas cambiando la

composición de la fase móvil a 5% de disolvente A / 95% de disolvente B. Las muestras que requerían una infusión directa para la espectrometría de masas en tándem, se inyectaron en una proteína Microtrap (Michrom) equilibrada en 98% de agua, 1% de acetonitrilo y 1% de ácido fórmico. Las muestras se lavaron con 1 mL de disolvente de equilibrio antes de ser eluidas en 300 μ L de 60% de acetonitrilo, 40% de agua y 0,1% de ácido fórmico. El eluyente se infundió directamente en el espectrómetro de masas FT-ICR a 2 μ L/min. Para el espectrómetro de masas Q-STAR Pulsar, se inyectaron entre 5-30 μ L de muestra en una proteína Microtrap (Michrom) mediante una HPLC Agilent series 1100. Las muestras se lavaron en 95% de disolvente A / 5% de disolvente B durante 1 minuto antes de la elución de los péptidos unidos en el espectrómetro de masas en 5% de disolvente A / 95% de disolvente B.

La escisión proteolítica de sRAGE expresado en *E. coli* unido al anticuerpo 11E6 y la elución de los péptidos que contenían epítomos, reveló la presencia de un péptido con una masa de 12.204,5 Da. La selección de la masa y la disociación activada por colisión del estado de carga 10^+ confirmaron la identidad de este péptido, que se correspondía a los residuos Val²²⁹-His³⁴⁶ (este residuo de His se debe a la adición del marcador Hexa-His a la proteína sRAGE). Además el cartografiado de epítomos usando tripsina seguida de proteólisis con quimotripsina, reveló la escisión del marcador hexahistidina C-terminal, refinando de este modo el epítomo a los residuos Val²²⁹-His³⁴¹ (este residuo de His se debe a la adición del marcador Hexa-His a la proteína sRAGE). No se pudo obtener un mayor refinamiento de este epítomo mediante proteólisis. Una escisión proteolítica ejecutada del mismo modo de sRAGE expresado en *E. coli* unido al anticuerpo 4E5, reveló el mismo péptido de 12.204,5 Da que se había observado para el epítomo del anticuerpo 11E6. En consecuencia, la escisión de sRAGE expresado en BacMam unido al anticuerpo 11E6 o 4E5, reveló dos epítomos principales que contenían péptidos de masas 10.671,9 Da y 10.614,0 Da. Estos péptidos se corresponden con el extremo C-terminal de la estructura artificial expresada en BacMam, que abarca los residuos Val²²⁹-Gly³³¹ y Val²²⁹-Ala³³⁰, respectivamente.

Una escisión proteolítica de sRAGE expresado en *BacMam* unido al anticuerpo 7F9 y la elución de los péptidos que contenían epítomos, reveló diversas especies que representaban 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, lo que sugiere un epítomo mínimo que abarca los residuos Asn¹⁰⁵-Arg²¹⁶.

Estos resultados indican que los anticuerpos 11E6 y 4E5 poseen epítomos en los extremos C-terminales de ambos sRAGE expresados en *E. coli* y en BacMam y que el anticuerpo 7F9 reconoce un epítomo en el dominio central de sRAGE expresado en BacMam.

Ejemplo 9: Biacore y mediciones de resonancia de plasmón superficial

La afinidad de los tres anticuerpos monoclonales de la presente invención, es decir, 7F9, 11E6 y 4E5, se midió usando Biacore y mediciones de resonancia de plasmón superficial.

9.1. Materiales y Métodos para las determinaciones cinéticas de la unión de anti-RAGE:

Un instrumento Biacore 2000 se utilizó para medir la cinética de unión del AcMo anti-RAGE de ratón. El formato del ensayo para el análisis de la afinidad del AcMo se basó en la captura de Fc a través de anticuerpos anti-Fc inmovilizados. Un protocolo de acoplamiento de amina convencional se empleó para inmovilizar IgG específica de Fc a través de aminas primarias a la superficie de carboxi-metil (CM) dextrano de chips sensores CM5 (Biacore). Para el estudio de AcMos anti-RAGE de ratón, se empleó anti-Fc de ratón (Biacore, anti-ratón, BR-1005-14) como reactivo de captura inmovilizado. Un protocolo automatizado, disponible en el Biacore 2000, fue utilizado para inmovilizar 8000-10000 UR de reactivo de captura en las 4 celdas de flujo del chip sensor. En pocas palabras, las superficies de CM-dextrano se activaron con 1:1 N-hidroxisuccinimida (NHS) 50 mM:3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida (EDC) 200 mM. A continuación, el reactivo de captura IgG anti-Fc (20 μ g/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 4,5) se aplicó a la superficie seguido de una desactivación de la superficie y el bloqueo de los sitios reactivos residuales con etanolamina 1 M (pH 8,5).

El tampón de migración utilizado era HBS-EP+ [HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, EDTA 3 mM, 0,05% de tensioactivo P20 (Biacore)] para los AcMos anti-RAGE de ratón. Cada ciclo experimental consistió en las siguientes etapas: 1) AcMos anti-RAGE fueron capturados en las celdas de flujo 2, 3 o 4 hasta un nivel de 50-200 UR (dependiendo del antígeno). Para todas las medidas se tomó como referencia la celda de flujo 1, que no capturaba el AcMo anti-RAGE. 2) El antígeno se inyectó a través de las 4 celdas de flujo, 180 μ l a 60 μ l/min. Después de la inyección del antígeno, la disociación se controló durante 600 segundos a 60 μ l/min. 3) La superficie de captura anti-Fc se regeneró con glicina a pH bajo. Para las determinaciones cinéticas, las inyecciones de RAGE eran una serie de diluciones de 2 veces desde 20 nM - 0,31 nM y tampón solo en duplicados aleatorios.

9.2. Evaluación y resultados

Los datos se procesaron utilizando el programa informático de evaluación de Biacore. Brevemente, se hizo una referencia doble a los datos, restando en primer lugar la señal de la celda de referencia y segundo, restando la señal de las inyecciones de solo tampón. Los datos con referencia doble de la serie de inyecciones de RAGE, se ajustaron después globalmente a un modelo de unión 1:1 (Langmuir), que incluía un término de transferencia de masas, para determinar las tasas constantes de la cinética de unión, k_a y k_d y la afinidad, K_D .

La Tabla 7 muestra que 4E5 no se unía a RAGE de ratón (Mu-RAGE). 11E6 y 4E5 competían entre sí de forma cruzada para unirse a RAGE. 7F9 no se une a RAGE producido en *E. coli* que carece de glicosilación.

La Tabla 7 muestra también los epítomos específicos a los que se unen los tres anticuerpos tal y como se describen en este documento, en RAGE humano, a través del cartografiado de epítomos usando una protección de sRAGE humano frente a la digestión proteolítica y una identificación de los péptidos protegidos con espectrometría de masas. AcMo 7F9 unido a C1 (Asn¹⁰⁵ - Pro²¹⁵); AcMo 4E5 unido a C2 (Val²²⁹ - Thr³⁴⁰ en RAGE de *E. coli*; Val²²⁹ - Gly³³¹ en husRAGE producido en células de mamíferos) y 11E6 unido a C2 (Val²³⁸ - Arg³¹⁴ en RAGE de *E. coli*; Val²²⁹ - Gly³³¹ en husRAGE producido en células de mamífero).

Tabla 7: epítomos a los que se unen los anticuerpos

AcMo	Afinidad (nM)	Epítomo	RAGE de ratón
7F9	0,11	C1; sensible a la glicosilación	+
11 E6	0,29	C2; solapamiento con 4E5	+
4E5	2,2	C2; solapamiento con 11 E6	-

Ejemplo 10: Estudios del volumen sanguíneo cerebral (VSC) *in vivo* en ratones C57BL/6 hembra

10.1. Animales

Ratones C57BL/6 hembra (4-6 meses de edad; Taconic, Germantown, Nueva York, EE.UU.) se mantuvieron en un lecho de virutas de madera estéril convencional, en una habitación tranquila en condiciones de 12 h de luz encendida/12 h de luz apagada (encendido a las 6:00), con comida y agua disponible *ad libitum*. Se utilizaron un total de 33 ratones en estudios de fMRI-VSC. Todos los estudios fueron aprobados y vigilados de cerca por el Comité Institucional de Cuidados y Usos de Animales de Abbott, adherido a las directrices de los Institutos Nacionales para la Guía del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en instalaciones acreditadas por la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidados de Animales de Laboratorio.

10.2. Preparación de péptidos A β solubles

A β 1-40 (>99% de pureza) se sintetizó en Abbott Laboratories. Brevemente, *E. coli* BL21 (DE3) se indujo con IPTG 1 mM y se expresó durante 3 horas a 41°C en un fermentador de 18 L. Se recogieron 185 g de pasta celular. El péptido se expresaba como cuerpos de inclusión. Las células se lisaron en tampón Tris 0,1 M que contenía 0,1% de Triton X100. Después, el sedimento se lavó 3 veces con tampón Tris 50 mM y una 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 hasta 1 L con 0,2% de amoníaco en agua. Esta muestra de 1 L se dializó frente a 19 L de 10% de etanol que contenía 0,1% de amoníaco. La diálisis continuó con solo 0,1% de amoníaco en agua durante un tiempo total de 5 horas a temperatura ambiente. La muestra de 1,4 L se diluyó con 0,1% de amoníaco hasta 2 L y se aplicó a una columna de 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. A β 1-40 eluyó durante un gradiente de 10 a 30% de B durante 200 minutos. El material agrupado se liofilizó. Se utilizó el análisis MALDI para confirmar la identidad y la pureza del material. El material se purificó como A β Met-1-40, marcado con N15. Una pequeña cantidad de sulfóxido de metionina estaba presente en las unidades de masa +16 en la muestra. Se purificaron 138 mg en esta sola migración como la sal de amonio del péptido. La secuencia inversa, A β 40-1 (>99% de pureza), se adquirió de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Los péptidos A β (0,01 o 0,1 mg) se disolvieron por separado en solución salina tamponada con fosfato de nuevo aporte (0,1 ml; PBS), justo antes de cada experimento fMRI-VSC. Para los estudios iniciales, los ratones fueron asignados al azar a cinco grupos de tratamiento: control PBS, A β 1-40 (0,01 o 0,1 mg/ratón) o A β 40-1 (0,01 o 0,1 mg/ratón), con cinco animales en cada grupo.

10.3. Preparación de anticuerpos

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

10.4. Medición de VSC utilizando fMRI

Todos los experimentos fMRI se realizaron en un imán horizontal de 7.0 T/21 cm con un inserto de gradiente de campo magnético de 20 G/cm (Biospec Bruker, Billerica, MA). Los animales fueron anestesiados primero con medetomidina (1 mg/kg, i.p., Pfizer Animal Health, Exton, Pennsylvania, EE.UU.) + ketamina (75 mg/kg, i.p.; Fort Dodge Animal Health, Iowa, EE.UU.) y se colocaron después en un contenedor de bobina doble para animales pequeños (Insight Neuroimagen Systems, LLC, Worcester, MA), que contenía una bobina de volumen para la transmisión y una bobina de superficie para la recepción. Las tasas de respiración y las formas de onda se vigilaron de forma continua a través de un transductor de fuerza. La temperatura rectal se controló y se mantuvo a 37 \pm 1°C a través de una almohadilla de agua circulante con retroalimentación regulada. Todas las imágenes se realizaron

durante la fase de luz. Una interacción electromagnética de bobina a bobina se desacopló de forma activa. Las imágenes anatómicas se tomaron mediante el uso de la secuencia de impulsos de espín rápido-eco potenciada por relajación adquisición rápida (RARE) con TR = 3 s, TE efectiva = 100 ms, matriz = 256 x 256, FOV = 2,56 cm x 2,56 cm, nueve cortes de 1,0 mm y cuatro promedios. La formación de imágenes eco-planares (EPI) de disparo simple con eco de gradiente se utilizó para la adquisición de imágenes fMRI-VSC con TR = 2 s, TE = 13 ms, matriz = 64 x 64, FOV = 2,56 cm x 2,56 cm y proporcionaron una resolución en el plano = 400 µm x 400 µm. Se administraron por vía intravenosa 10 mg de Fe/kg de un agente de contraste de óxido de hierro superparamagnético ultrapequeño (USPIO) (SH U555C, Schering AG, Alemania) durante 2 min en una adquisición de imágenes de 18 min. Aβ soluble y PBS se administraron a través de la vena de la cola, 6 min después del agente de contraste usando una bomba en jeringa (0,1 ml/min durante 1 min) y los cambios en el VSC se detectaron a continuación durante un período posterior de 10 min. El anticuerpo de control IgG1 o 11E6 se administró por vía i.p. a los ratones en sus jaulas, 3 horas antes del comienzo de los estudios de formación de imagen.

10.5. Análisis de los datos de fMRI

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete de programas informáticos para el análisis de neuroimágenes funcionales (AFNI) (Cox R W, Comput Biomed Res 29:162-173, 1996). Para identificar el cambio de VSC relativo dependiente del tiempo, se calculó rVSC(t) a partir de los datos crudos del curso temporal basados en la relación (Mandeville et al., 1999),

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

en donde s(t) es la intensidad de la señal después de la infusión de Aβ o PBS, So(t) es la señal de línea de base antes de la infusión de Aβ o PBS y S_{pre} es la intensidad de la señal media antes de la administración del agente de contraste. Los cambios del curso temporal de VSCr, se ajustaron con una función lineal para tener en cuenta la eliminación del agente de contraste de la sangre (Cox, 1996).

A continuación, la señal de VSCr para cada vóxel en cada ratón se ajustó a un modelo exponencial diferencial no lineal (ecuación 2, eq. 2) que reflejaba la cinética del fármaco (Luo et al., 2004), en donde t₀ es el tiempo de retardo de la respuesta, k es el coeficiente multiplicativo, α₁ es la tasa de eliminación y α₂ la tasa 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 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 las cinéticas conocidas de Aβ (Shiiki et al., J Neurosci 24: 9632-9637, 2004). Los valores finales para t₀, k, α₁ y α₂ se determinaron automáticamente mediante AFNI en base a la significancia máxima del ajuste del modelo. Los vóxeles de VSCr activados se determinaron a continuación con p < 0,05 después de la corrección de Bonferroni.

Los resultados mostrados en la Figura 8 indican que Aβ₁₋₄₀ disminuía el VSC de una manera dependiente de la dosis y específica de la región (con 0,01 mg en Fig. 8a y con 0,1 mg en Fig. 8b). El grado de disminución del VSC era significativamente mayor cuando los ratones se trataron con la dosis alta (Fig. 8b) en comparación con la dosis más baja (Fig. 8a) de Aβ₁₋₄₀, aunque se vieron afectadas regiones cerebrales similares (por ejemplo, la corteza frontal, núcleo caudado, tálamo, hipocampo). En contraste con los efectos dependientes de la dosis de Aβ₁₋₄₀, el péptido inverso, Aβ₄₀₋₁, no afectaba significativamente al VSC cuando se sometió a ensayo con las mismas dosis (con 0,01 mg en Fig. 8c y con 0,1 mg en Fig. 8d) y el grado de cualquier disminución del VSC observado no difería significativamente del grupo control tratado con PBS (PBS, Fig. 8e). Durante un curso temporal de 12 minutos, la amplitud de las disminuciones en VSC inducidas por Aβ₁₋₄₀, que variaban de 10-20% para los vóxeles afectados en varias regiones del cerebro, alcanzó consistentemente un máximo, 5 min después de la administración, se mantuvo reducida durante el estudio (datos representativos mostrados para el hipocampo en la Fig. 8f) y fue similar para ambas dosis de Aβ₁₋₄₀. Estos datos son consistentes con un estudio adicional que empleaba la técnica invasiva de flujometría Doppler con láser (no mostrado).

Para someter a ensayo los efectos de 11E6 sobre VSC utilizando fMRI, los efectos de la preadministración de un anticuerpo de control IgG1 se evaluaron en primer lugar. Como se preveía, una administración previa de un anticuerpo IgG1 3 horas antes del comienzo de la formación de imágenes, no bloqueaba el efecto de un estímulo con Aβ₁₋₄₀ (con 0,01 mg en Fig. 9a). Por el contrario, 11E6 a una dosis de 0,1 mg/ratón administrado 3 horas antes del comienzo de la formación de imágenes, bloqueaba completamente la disminución del VSC, provocada normalmente por un estímulo con Aβ₁₋₄₀ (con 0,1 mg en Fig. 9b). Del mismo modo, la disminución de la amplitud de VSC también se suprimió mediante el pretratamiento con el anticuerpo anti-RAGE, 11E6, pero no con el anticuerpo de control (Fig. 9c). Estos datos muestran *in vivo* la actividad funcional del anticuerpo, 11E6, en un modelo animal relevante para la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 11: Construcción de anticuerpos injertados con CDRs

Mediante la aplicación de métodos convencionales bien conocidos en la técnica, las secuencias de CDRs de las cadenas VH y VL del anticuerpo monoclonal 11E6 (véase la Tabla 4 más arriba) se injertaron en diferentes

secuenciasceptoras de cadena pesada y ligera humanas. Basándose en las alineaciones de secuencias de VH y VL con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal 11E6 de la presente invención, se seleccionan las siguientes secuencias humanas conocidas:

- 5 a) VH7-4.1 y VH1-2, así como las secuencias conectoras hJH6 para la construcción de secuenciasceptoras de cadena pesada (de acuerdo con la Tabla 2 más arriba);
- b) 1-12/L5 y 3-15/L2, así como hJK2 para la construcción de secuenciasceptoras de cadena ligera (de acuerdo con la Tabla 3 anterior).

10 Mediante el injerto de las correspondientes CDRs de VH y VL de 11E6 en dichas secuenciasceptoras, se prepararon las siguientes secuencias de VH y VL modificadas, humanizadas con CDRs injertadas, (véase también la Tabla 5, más arriba): VH 11E6.1-GL, VH 11E6.2-GL, VL 11E6.1-GL y VL 11E6.2-GL.

Ejemplo 12: Construcción de las retromutaciones estructurales en anticuerpos con CDRs injertadas

15 Para generar mutaciones estructurales de anticuerpos humanizados, las mutaciones se introducen en los anticuerpos injertados con CDRs, utilizando una síntesis *de novo* de dominios variables y/o cebadores mutagénicos y PCR, usando métodos bien conocidos en la técnica. Las diferentes combinaciones de retromutaciones y otras mutaciones se construyen para cada uno de los injertos de CDRs del modo siguiente.

Para la cadena pesada VH 11E6.1-GL uno o varios de los siguientes residuos Vernier y de interconexión VH/VL se retromutaron de la siguiente manera: V2 →I y/o Y95 →F.

Para la cadena pesada VH 11E6.2-GL uno o varios de los siguientes residuos Vernier y de interconexión VH/VL se retromutaron de la siguiente manera: V2→I, V68→F, M70→F, R72→L, Y95→F.

20 Para la cadena ligera VL 11E6.1-GL uno o varios de los siguientes residuos Vernier y de interconexión VH/VL se retromutaron de la siguiente manera: A43→S, Y49→F, Y87→F.

Para la cadena ligera VL 11E6.2-GL uno o varios de los siguientes residuos Vernier y de interconexión VH/VL se retromutaron de la siguiente manera: A43→S, Y49→F, I58→V, Y87→F.

Las mutaciones adicionales incluyen las siguientes:

- 25 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
 - VL 11E6.1-GL, V11→L y para
 - 30 VL 11E6.2-GL, V13→L, E70→D.

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

35 Los vectores de expresión pHybE que incluyen cadenas pesadas y ligeras que contienen retromutaciones estructurales se cotransfectaron en células 293-6E para producir de forma transitoria anticuerpos humanizados de longitud completa. Las mutaciones se introdujeron en las secuencias de anticuerpos injertadas con CDRs tal como se habían preparado de acuerdo con el Ejemplo 11, mediante síntesis *de novo* del dominio variable y/o empleando cebadores mutagénicos y PCR y métodos bien conocidos en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos humanizados se describen en la Tabla 8.

Tabla 8: Expresión de anticuerpos humanizados

SEQ ID NO	Región proteica	Secuencia
		123456789012345678901234567890
62	VH h11E6.1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWNGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTITVTVSS
63	VL h11E6.1	

ES 2 579 554 T3

SEQ ID NO	Región proteica	Secuencia
		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
62	VH h11E6.2	EVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCARSRMVTAYGMDYWGQGTITVTVSS
64	VL h11E6.2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKSPKLLIFASASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
62	VH h11E6.3	EVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCARSRMVTAYGMDYWGQGTITVTVSS
65	VL h11E6.3	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCASQNVG TAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYTGIPA RFGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
62	VH h11E6.4	EVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCARSRMVTAYGMDYWGQGTITVTVSS
66	VL h11E6.4	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCASQNVG TAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGVPA RFGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYFCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
67	VH h11E6.5	EIQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYFCARSRMVTAYGMDYWGQGTITVTVSS
63	VL h11E6.5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR
67	VH h11E6.6	EIQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFT NFGMNWVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYFCARSRMVTAYGMDYWGQGTITVTVSS
64	VL h11E6.6	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKSPKLLIFASASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQ YSSYPLTFGQGTKLEIKR

ES 2 579 554 T3

SEQ ID NO	Región proteica	Secuencia
67	VH h11E6.7	EIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVFVSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTTVTVSS
65	VL h11E6.7	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQNVG TAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYTGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
67	VH h11E6.8	EIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVFVSLDTSVSTAYLQICSLKAED TAVYFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTTVTVSS
66	VL h11E6.8	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQNVG TAVAWYQQKPGQSPRLLIFASNRYTGVP A RFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYFC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
68	VH h11E6.9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVTMTRDTSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
63	VL h11E6.9	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTG VPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
68	VH h11E6.10	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVTMTRDTSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
64	VL h11E6.10	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKSPKLLIFASNRYTG VPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
68	VH h11E6.11	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVTMTRDTSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
65	VL h11E6.11	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQNVG TAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYTGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
68	VH h11E6.12	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR RVTMTRDTSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
66	VL h11E6.12	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQNVG TAVAWYQQKPGQSPRLLIFASNRYTG VPA RFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYFC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
69	VH h11E6.13	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR FTFLDTSSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSVTVSS
63	VL h11E6.13	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTG VPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR

SEQ ID NO	Región proteica	Secuencia
69	VH h11E6.14	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR FTFTLDLSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSTVTVSS
64	VL h11E6.14	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQNVG TAVAWYQQKPGKSPKLLIF SASNRYTGVPS RFGSGSGTDFTLTITSSIQPEDFATYFCQQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
69	VH h11E6.15	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR FTFTLDLSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSTVTVSS
65	VL h11E6.15	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCASQNVG TAVAWYQQKPGQAPRLLIY SASNRYTGVPA RFGSGSGTDFTLTITSSIQSEDFAVYYCQQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR
69	VH h11E6.16	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFT NFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTNTGESIY SEEFKGR FTFTLDLSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR SRMVTAYGMDY WGQGTSTVTVSS
66	VL h11E6.16	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCASQNVG TAVAWYQQKPGQSPRLLIY SASNRYTGVPA RFGSGSGTDFTLTITSSIQSEDFAVYYCQQ YSSYPLT FGQGTKLEIKR

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.

5 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 siguientes mutaciones Vernier y retromutaciones de residuos de interconexión VH/VL: 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.

10 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 mutaciones Vernier y retromutaciones de residuos de interconexión VH/VL: V2→I, V68→F, M70→F, R72→L y Y95→F.

Para las cadena ligeras:

VL h11E6.1, VL h11E6.5, VL h11E6.9 y VL h11E6.13 contienen VL 11E6.1-GL con una mutación V11→L.

15 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 siguientes mutaciones Vernier y retromutaciones de residuos de interconexión 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 una mutación V13→L y E70→D.

20 VL h11E6.4, VL h11E6.8, VL h11E6.12 y VL h11E6.16 contienen VL 11E6.2-GL con una mutación V13→L y E70→D y las siguientes mutaciones Vernier y retromutaciones de residuos de interconexión VH/VL: A43→S, Y49→F, 158→V y V87→F.

Ejemplo 14: Caracterización de anticuerpos 11E6 humanizados utilizando ELISA competitivo

25 Las placas de 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 sódico 0,2 M, pH 9,4, se lavaron con tampón de lavado (PBS que contenía 0,1% de Tween 20) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl/pocillo de leche desnatada en polvo al 2% en PBS. Después de lavar con tampón de lavado, una mezcla de un anticuerpo m11E6 biotinilado (0,3 µg/ml de concentración final) y anticuerpo del ensayo competitivo, sin marcar que partía de 81 µg/ml de concentración final y diuyendo en serie 3 veces) en 50 µl/pocillo de tampón de ELISA, se añadió por duplicado. Después de incubar las placas durante 1 hora a temperatura ambiente y lavar con tampón de lavado, se detectaron

los anticuerpos unidos usando 100 μ l/pocillo de una dilución 1:10.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Fitzgerald) en tampón de ELISA. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y de lavar con tampón de lavado, el desarrollo de color se llevó a cabo mediante la adición de 100 μ l/pocillo de tampón TMB (Zymed). Después de incubar durante 15 min a temperatura ambiente, el desarrollo de color se detuvo mediante la adición de 50 μ l/pocillo de ácido clorhídrico 1 N. Se leyó la absorbancia a 490 nm. La Tabla 9 muestra los valores de CI_{50} de anticuerpos 11E6 humanizados obtenidos utilizando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Tabla 9: Valores de CI_{50} de anticuerpos 11E6 humanizados en un ELISA competitivo

Anticuerpo	CI_{50} (nM)	Anticuerpo	CI_{50} (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
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

10 **Ejemplo 15: Determinación de las constantes de unión para la interacción de AcMo anti-RAGE con RAGE**

Se emplearon instrumentos Biacore 2000 y Biacore T100 para medir la cinética de la unión del AcMo anti-RAGE. El formato del ensayo para el análisis de la afinidad del AcMo era una captura basada en Fc a través de anticuerpos anti-Fc inmovilizados. Un protocolo de acoplamiento de amina convencional se empleó para inmovilizar IgG específica de Fc a través de aminas primarias a la superficie de carboxi-metil (CM) dextrano de chips de sensores CM5 (Biacore). Para el estudio de AcMos anti-RAGE de ratón, se empleó anti-Fc de ratón (Biacore, anti-ratón, BR-1005-14) como reactivo de captura inmovilizado y para el estudio de AcMos anti-RAGE humanizados, se utilizó anti-Fc humano (Pierce 31125) como reactivo de captura inmovilizado. Un protocolo automatizado, disponible en Biacore 2000 y Biacore T100, se utilizó para inmovilizar 8000-10000 UR de reactivo de captura en las 4 celdas de flujo del chip de sensor. Resumiendo, las superficies de CM-dextrano se activaron mediante 1:1 N-hidroxisuccinimida (NHS) 50 mM:3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida (EDC) 200 mM. A continuación, el reactivo de captura de IgG anti-Fc (20 μ g/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 4,5) se aplicó a la superficie, seguido de una desactivación de la superficie y el bloqueo de los sitios reactivos residuales con etanolamina 1 M (pH 8,5).

El tampón de migración empleado era PBS-P [1X PBS (Sigma P3813), pH 7,4, 0,005% de tensioactivo P20 (Biacore)] para los anticuerpos humanizados. Cada ciclo experimental consistió en las siguientes etapas: 1) AcMos anti-RAGE fueron capturados en las celdas de flujo 2, 3 o 4 a un nivel de 50-200 UR (dependiendo del antígeno). Todas las mediciones se realizaron tomando como referencia la celda de flujo 1, que no tenía AcMo anti-RAGE capturado. 2) El antígeno se inyectó a través de las 4 celdas de flujo, 240 μ l a 80 μ l/min. Después de la inyección de antígeno, la disociación se controló durante 600 segundos a 80 μ l/min. 3) la superficie de captura anti-Fc se regeneró con glicina a pH bajo. Para las determinaciones cinéticas, las inyecciones de antígeno fueron una serie de diluciones triples partiendo de 30 nM - 0,12 nM (para sRAGE [RAGE (1-331)]) y tampón solo en duplicados aleatorios.

Los datos se procesaron utilizando el programa informático de evaluación de Biacore o Scrubber 2.0 (BioLogic Software). Brevemente, los datos se referenciaron por duplicado, primero restando la señal de la celda de referencia y segundo, restando la señal de las inyecciones de solo tampón. Los datos con referencia por duplicado para las series de inyección de RAGE, se ajustaron a continuación, de forma global a un modelo de unión 1:1 (Langmuir), que incluía un término de transferencia de masa, para determinar las tasas constantes de la cinética de unión, k_a y k_d y la afinidad, K_D ($k_a = k_{on}$; $k_d = k_{off}$)

Tabla 10: Datos de Biacore

AcMo 11E6	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (pM)	Dev. Est. de Resid
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

AcMo 11E6	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D (pM)$	Desv. Est. de Resid
11E6 de ratón	1,8E + 07	1,3E-03	68	1,4

Los valores de K_D son pM de dígito doble para los tres AcMos y no parece haber una distinción significativa entre los tres AcMos con respecto a sus cinéticas de unión. En un experimento simultáneo, el AcMo 11E6 de ratón original se evaluó con este antígeno (sRAGE humano 1-331, V nº 400) y también era una K_D pM de dígito doble.

- 5 El AcMo de ratón original 11E6 se había informado anteriormente que era 290 pM. Sin embargo esos primeros experimentos utilizaron un sistema de tampón diferente (tampón HBS-EP+ de Biacore: HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% de P20). La elección de tampón puede, por supuesto, afectar a la cinética.

Ejemplo 16: Estudios *in vivo* del volumen sanguíneo vascular cerebral (VSC) en ratones Tg2576 de edad avanzada

10 16.1. Animales

El modelo de ratón Tg2576 de enfermedad de Alzheimer (Hsiao et al., 1996) expresa la mutación sueca de APP (APPK670N, M671L) a un nivel elevado bajo el control del promotor de la proteína priónica de hámster (PrP). Está bien establecido que esta mutación causa aumentos concomitantes en Ab42 y Ab40 secretados. Conforme los ratones Tg2576 envejecen, aparecen placas que son similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer. Además, los ratones Tg2576 desarrollan déficit de comportamiento dependiente de la edad, tal como se evaluó con la prueba de laberinto Y, laberinto T y de laberinto en agua de Morris (Hsiao et al. (1996) Correlative memory deficits, Ab elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 274:99 -102).

16.2 Preparación de los anticuerpos

20 Un anticuerpo de control IgG negativo y el anticuerpo anti-RAGE, 11E6 (ambos con >99% de pureza), fueron sintetizados en Abbott Laboratories.

16.3. Medición de VSC utilizando fMRI

Los experimentos fMRI-VSC se realizaron sobre un imán horizontal 7.0 T/21 cm con un inserto de gradiente de campo magnético de 20 G/cm (Biospec Bruker, Billerica, MA). Ratones Tg2576 envejecidos (19-20 meses de edad) fueron anestesiados primero con medetomidina ((1 mg/kg, i.p., Pfizer Animal Health, Exton, Pennsylvania, EE.UU.) + ketamina (75 mg/kg, i.p.; Fort Dodge Animal Health, Iowa, EE.UU.) y se colocaron después en un contenedor para animales pequeños de bobina doble (Insight Neuroimagen Systems, LLC, Worcester, MA), que contenía una bobina de volumen para la transmisión y una bobina de superficie para la recepción. Las tasas de respiración y las formas de onda se vigilaron de forma continua a través de un transductor de fuerza. La temperatura rectal se controló y se mantuvo a $37 \pm 1^\circ C$ a través de una almohadilla de agua circulante con retroalimentación regulada. Todas las imágenes se realizaron durante la fase de luz. Una interacción electromagnética de bobina a bobina se desacopló de forma activa. Las imágenes anatómicas se tomaron mediante el uso de la secuencia de impulsos de espín rápido-eco potenciada por relajación adquisición rápida (RARE) con TR = 3 s, TE efectiva = 100 ms, matriz = 256 x 256, FOV = 2,56 cm x 2,56 cm, nueve cortes de 1,0 mm y cuatro promedios. La formación de imágenes eco-planares (EPI) de disparo simple con eco de gradiente se utilizó para la adquisición de imágenes fMRI-VSC con TR = 2 s, TE = 13 ms, matriz = 64 x 64, FOV = 2,56 cm x 2,56 cm y se proporcionó una resolución en el plano = 400 μm x 400 μm . Se administraron por vía intravenosa 10 mg de Fe/kg de un agente de contraste de óxido de hierro superparamagnético ultrapequeño (USPIO) (SH U555C, Schering AG, Alemania) durante 2 min en una adquisición de imágenes de 18 min. El anticuerpo 11E6 de ratón o IgG1 de ratón no específica (anticuerpo de control) se administraron a través de la vena de la cola, 6 min después del agente de contraste usando una bomba en jeringa (0,1 mL/min durante 1 min) y los cambios en el VSC se detectaron a continuación durante un período posterior de 10 min.

16.4 Análisis de los datos de la fMRI

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete de programas informáticos para el análisis de neuroimágenes funcionales (AFNI) (Cox, 1996). Para identificar el cambio de VSC relativo dependiente del tiempo, se calculó $rVSC(t)$ a partir de los datos crudos del curso temporal basados en la relación (Mandeville et al., 1999),

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

en donde $s(t)$ es la intensidad de la señal después de la infusión de A β o PBS, $S_0(t)$ es la señal de línea de base antes de la infusión de A β o PBS y S_{pre} es la intensidad de la señal media antes de la administración del agente de contraste. Los cambios del curso temporal de VSCr no se ajustaron con una función lineal para tener en cuenta la eliminación del agente de contraste de la sangre (Cox, 1996).

A continuación, la señal de VSCr 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), en donde t_0 es el tiempo de retardo de la respuesta, k es el coeficiente multiplicativo, α_1 es la tasa de eliminación y α_2 la tasa de absorción.

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

5 Los valores finales para t_0 , k , α_1 y α_2 se determinaron automáticamente mediante AFNI en base a la significancia máxima del ajuste del modelo. Los vóxeles de VSCr activados se determinaron a continuación con $p < 0,05$ después de la corrección de Bonferroni. Los vóxeles activados del cerebro completo con incremento del VSC fueron registrados. Dado que los datos no transformados no confirman los supuestos del ANOVA, se empleó la transformación Box-Cox para asegurar una normalidad adecuada y homogeneidad de la varianza. El efecto de 11E6 es estadísticamente significativo frente a IgG1 ($p < 0,05$) en ratones Tg2576 de 19 meses de edad, en el modelo fMRI-VSC.

10 Los resultados se muestran en la Figura 10 adjunta. Nuestros datos extienden los resultados de Deane (Deane et al., 2003) que muestran que anticuerpos policlonales anti-RAGE dirigidos contra una variedad de epítomos dentro de RAGE, pueden mejorar la perfusión sanguínea cerebral en ratones transgénicos en APP. Nuestros datos muestran, por primera vez que un anticuerpo monoclonal 11E6 que se dirige al dominio C2 dentro de RAGE, aumenta la perfusión sanguínea cerebral en ratones transgénicos en APP. Este efecto está mediado probablemente por la unión competitiva de alto nivel de A β con RAGE. Un nivel elevado de A β existe en el cerebro y el plasma debido a la hiperexpresión de APP humana. El tratamiento de pacientes con EA con 11E6 puede aumentar de este modo la perfusión cerebral en estos pacientes, conduciendo potencialmente a una mejora de las funciones neuronales. Al mismo tiempo, el tratamiento de los pacientes podría estar controlado potencialmente siguiendo el flujo sanguíneo cerebral durante el tratamiento.

Ejemplo 17: Protección de las neuronas del hipocampo contra la escisión de dinamina inducida con A β a través del anticuerpo 11E6

17.1. Cultivo de neuronas del hipocampo

25 Las neuronas del hipocampo de rata se prepararon de acuerdo con la bibliografía (Goslin y Banker. (1991) Rat Hippocampal Neurons in Low-Density Culture. En: Banker G y Goslin K (compiladores). Culturing Nerve Cells, MIT Press, Cambridge) con una ligera modificación. Brevemente, hipocampos de ratas embrionarias de 19 días se diseccionaron y se liberaron de las meninges. Las neuronas del hipocampo se obtuvieron por tripsinización del tejido (0,1% de tripsina / 17-20 min / 37°C) seguido por una trituración con pipetas Pasteur pulidas con fuego. Las neuronas del hipocampo se sembraron en placas con una densidad de 0,2-1,0 x 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% de penicilina-estreptomina; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ durante al menos 21 días y un tercio del medio se cambió una vez a la semana.

17.2. Escisión de dinamina inducida con A β

35 A β se agregó de acuerdo con 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 ligeras modificaciones. Brevemente, A β 1-40 (American Peptide, Sunnyvale, CA) se disolvió en medio de cultivo exento de suero a 0,1 mg/ml y se incubó durante 4 días a 37°C. El anticuerpo monoclonal anti-RAGE 11E6, un anticuerpo monoclonal de control de isotipo IgG1 dirigido contra KLH (hemocianina de lapa californiana de Megathura crenulata, Abbott) o PBS, se incubaron con la A β agregada durante 1 hora a 25°C, con 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 (calculada 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 otras 24 horas y se inspeccionaron brevemente mediante microscopía óptica antes de ser procesadas por transferencia Western. El tratamiento con A β no indujo una muerte neuronal manifiesta durante el periodo de incubación.

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

50 El medio de cultivo se retiró y las células se lavaron una vez con PBS. Las células se lisaron mediante la adición de tampón frío (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; 1% de NP-40; 1% de Triton X-100; EDTA 2 mM) que contenía mezclas de inhibidor de proteasa y fosfatasa (Roche, Mannheim, Alemania). Las células se rasparon y el material homogeneizado se centrifugó a 13000 g a 4°C durante 5 min. Se retiró el material sobrenadante y la concentración total de proteína se determinó por el método de Bradford utilizando un kit comercial (Bio-Rad, Múnich, Alemania). La proteína se diluyó hasta 1 μ g/l en tampón de carga (Bio-Rad, Múnich, Alemania) y se hirvió durante 5 min. Se realizó la migración de 25 μ g de cada muestra en un SDS-PAGE al 4-20% (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se transfirió 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 1/4 a 1/5 de la proteína

se cargó en SDS-PAGE. Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1-2 h usando 1x reactivo bloqueante (Roche, Mannheim, Alemania) y luego se incubaron con anticuerpo primario contra dinamina I (PA-1-660; dilución 1:1000; Affinity BioReagents, Golden, Co) a 4°C durante una noche. Posteriormente, un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (IgG de cabra anti-conejo, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) se aplicó a las transferencias a temperatura ambiente durante 1 h y se detectó usando quimioluminiscencia mejorada (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate; Pierce, Rockford, Illinois). Las señales de la inmunotransferencia se visualizaron con un sistema VersaDoc (Bio-Rad, Múnich, Alemania) y la señal de dinamina I intacta (~100 kDa) se cuantificó usando el programa informático Quantity One (Bio-Rad, Múnich, Alemania). Para la normalización, las transferencias se rayaron (tampón de rayado de transferencia Western; Pierce, Rockford, IL) durante 30 min a 37°C, se lavaron en PBS y se volvieron a examinar con un anticuerpo primario dirigido contra tubulina β III (TuJ-1, dilución 1:1000, Abcam, Cambridge, MA) y un anticuerpo secundario (IgG de burro anti-ratón, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). La media de la expresión de dinamina I normalizada de células no tratadas con A β , se fijó como 100%. Se analizaron los datos del porcentaje de tres experimentos distintos para estudiar la significancia estadística de una ANOVA de un factor (prueba de Kruskal-Wallis) seguida por la prueba de Dunn (GraphPad Prism[®]; GraphPad Software, San Diego, Ca).

17.4. El anticuerpo anti-RAGE 11E6 protege las neuronas del hipocampo contra una escisión de dinamina inducida con A β

La A β 1-40 agregada ha mostrado recientemente que induce la escisión de la proteína marcadora sináptica dinamina I en las neuronas del hipocampo (Kelly et al., 2005; Kelly y Ferreira, 2006). De acuerdo totalmente con los resultados publicados, observamos una marcada disminución de la cantidad de dinamina I intacta (~100 kDa) después de la incubación de neuronas del hipocampo con A β agregada durante 24 horas y un aumento concomitante de un producto de escisión de ~ 90 kDa (Fig. 11, panel superior). La preincubación de A β con el anticuerpo anti-RAGE 11E6 impidió la escisión de aproximadamente un 70%. Por el contrario, un anticuerpo de control de isotipo IgG1 murino no relacionado con RAGE no proporcionó ninguna protección (Fig. 11, panel superior). Una exploración densitométrica de las muestras por triplicado, la normalización a la cantidad de una proteína de control (tubulina β III) y el análisis de los datos de tres experimentos independientes, reveló la significancia estadística del efecto protector observado (Figura 11, panel inferior; ANOVA de un factor, $p < 0,05$).

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

18.1. Ensayo A

Se prepararon cultivos de cortes organotípicos del hipocampo en un protocolo modificado de Stoppini et al. (Journal of Neuroscience Methods, 37, n° 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 sobre membranas Millicell-MC (Millipore, Billerica, EE.UU.) en medio rico en potasio durante 3 días y más tarde en medio A neurobasal complementado en la interfase líquido/gas a 34°C/5% de CO₂.

Los cultivos de cortes de hipocampo de rata se prepararon a partir de ratas Wistar de 9 días de edad y se utilizaron al cabo de 15-16 días *in vitro*. Los cultivos de cortes se incubaron durante una noche con

- globulómero 1-42 1 μ M,
- 11E6 0,1 μ M (purificación de AcMo de RAGE ML 39-11E6 n° 4194, muestra n° 6116) + globulómero 1-42 1 μ M
- control (globulómero ultrafiltrado + SDS)

En el grupo de coincubación se aplicó el anticuerpo al medio de cultivo de secciones, 2 horas antes del globulómero. Se realizaron registros en una cámara de registro de interfase con perfusión continua, con fluido cerebroespinal artificial. Los potenciales postsinápticos de excitación de campo se registraron en la región CA1 después de la estimulación de la colateral de Schaffer con impulsos bifásicos a diferentes intensidades de tensión. La colateral de Schaffer se estimuló con impulsos bifásicos (0,1 ms/fase), utilizando un electrodo de tungsteno bipolar 0,5 M (WPI; Saraosta EE.UU.) y las amplitudes fEPSP se registraron con electrodos de vidrio cargados con LCRa (0,7-1,1 Megaohmio, GC150F-15, Harvard Apparatus, Hugstetten, Alemania). Las señales fueron digitalizadas mediante un CED 1401 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Reino Unido) y se analizaron utilizando la señal 2.14 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Reino Unido).

Los resultados se muestran en la Figura 12A. La aplicación de globulómero suprime fuertemente la transmisión sináptica. Una aplicación conjunta de 11E6 0,1 μ M revierte completamente los déficits inducidos por globulómeros. Por lo tanto, 11E6 puede revertir los déficits inducidos por globulómeros en la transmisión sináptica.

18.2. Ensayo B

Cultivos de cortes de hipocampo de rata se prepararon a partir de ratas Wistar de 9 días de edad y se utilizaron a los

16-18 días *in vitro*. Los cultivos de cortes se incubaron durante una noche con

- globulómero 1-42 1 μM ,
- AcMo de IgG1 0,1 μM H35C206 (KLH) + globulómero 1-42 1 μM
- control (SDS)

5 Los registros se realizaron (en líquido cefalorraquídeo artificial) a partir de CA1, después de la estimulación de la colateral de Schaffer con diferentes intensidades.

Los resultados se muestran en la Figura 12B. La aplicación de globulómero suprime fuertemente la transmisión sináptica. La aplicación conjunta de IgG1 no revertió los déficits inducidos por globulómero. Por lo tanto, el anticuerpo de control IgG no revierte los déficits inducidos por globulómero en la transmisión sináptica a 0,1 μM .

10 **Ejemplo 19: Análisis *in situ* del efecto del anticuerpo 11E6 sobre placas amiloides en la corteza frontal de ratones Tg2576.**

Para estos experimentos se emplearon ratones de 14,5 meses de edad Tg2576 (Hsiao et al., 1996, Science, 274(5284), 99-102). Los ratones hiperexpresaban APP humana con la denominada mutación sueca (K670N/M671L) y formaban depósitos de β amiloide en el parénquima cerebral, aproximadamente a los 11 meses de edad. Comenzando a los 12 meses de edad, se inyectó a los ratones 500 μg de 11E6 (n = 19) por vía i.p. (intraperitoneal) o un anticuerpo de control IgG1 (n = 19), una vez por semana durante 12 semanas. Después de la última inyección, los animales fueron anestesiados profundamente y perfundidos transcardialmente con solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) para enjuagar la sangre. A continuación, se extirpó el cerebro del cráneo y se dividió longitudinalmente. Un hemisferio del cerebro fue congelado de inmediato, el otro se fijó mediante inmersión en paraformaldehído al 4%. El hemisferio fijado por inmersión se crioprotegió por inmersión en 30% de sacarosa en PBS y se montó en un microtomo de congelación. Todo el cerebro anterior se cortó en secciones de 40 μm 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 amiloides que contenían A β se realizó con el anticuerpo monoclonal de ratón 6G1 generado contra A β monomérica (Barghorn et al., 2005, J. Neurochem. Sobre un dispositivo de tinción automática (Ventana Discovery®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el siguiente protocolo:

- las secciones sobre 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 de diamino bencidina cromogénica (DAB) que contenía etapas de lavado y de bloqueo y una tinción con el kit DAB Map TM; la recuperación de antígenos y la inmunohistoquímica primaria y secundaria fueron incluidas por el experimentador en el protocolo automatizado:
- se obtuvo la recuperación de antígenos en presencia de acondicionador nº 2 (tampón basado en citrato, pH 6,0) a 95°C durante 45 minutos
- incubación con 6G1 (1:500) en diluyente de anticuerpo (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a 37°C durante 3 horas
- incubación con anticuerpo secundario biotinilado de burro anti-IgG de ratón (1:500; Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Reino Unido) a 37°C durante 30 minutos
- después de la finalización de la tinción automatizada, los portaobjetos se lavaron en agua corriente, se deshidrataron en etanoles graduados, se aclararon en XTRA-Solve® (J.T. Baker, Griesheim, Alemania) y se cubrieron con UltraKitt® (J.T. Baker, Griesheim, Alemania)

La tinción de las placas se cuantificó en 3 secciones histológicas del neocórtex utilizando el sistema de análisis de imágenes ImagePro 5.0. El experimentador era ciego para el tratamiento del ratón analizado, y se determinaron los siguientes parámetros: área del neocórtex, área cubierta con tinción positiva para 6G1 y número de placas teñidas. Estos parámetros eran variables y no estaban distribuidos de manera normal. Por lo tanto, una reducción de la carga de placa se evaluó estadísticamente con una prueba U de Mann-Whitney de un lado. Los resultados de la tinción de depósitos de A β en ratones Tg2576 se muestran en la Figura 13.

La evaluación de los depósitos de DAB de color marrón mostró que el anticuerpo anti-RAGE reducía el número y el área de las placas amiloides en el neocórtex en un 24,5% y 26,8%, respectivamente (p <0,1). La reducción del número de placas y del área era más evidente en el neocórtex frontal (p <0,05).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott GmbH & Co. KG Abbott Laboratories

<120> Anticuerpos para el receptor de productos terminales de glicación avanzada (RAGE) y usos de los mismos

<130> M/49231-PCT

5 <160> 94

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 119

10 < 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

15 <210> 2

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

20 < 223> VH 7F9 CDR-H1

<400> 2

Asn Tyr Trp Met Asp
1 5

<210> 3

< 211> 19

ES 2 579 554 T3

< 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> VH 7F9 CDR-H2

5 <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

10 <220>
 < 223> VH 7F9 CDR-H3

<400> 4
 Asn Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5

15 <210> 5
 < 211> 108
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

20 <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 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

25 <210> 6
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

ES 2 579 554 T3

<220>
< 223> VL 7F9 CDR-L1

<400> 6
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala
1 5 10

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

10 <220>
< 223> VL 7F9 CDR-L2

<400> 7
Trp Thr Ser Thr Arg His Thr
1 5

15 <210> 8
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Artificial

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

20 <400> 8
Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
1 5

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

25 <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

ES 2 579 554 T3

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

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

5 <210> 10
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> VH 11E6 CDR-H1

10 <400> 10
 Asn Phe Gly Met Asn
 1 5

<210> 11
 < 211> 17
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

15 <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

20 <210> 12
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> VH 11E6 CDR-H3

ES 2 579 554 T3

<400> 12
 Ser Arg Met Val Thr Ala Tyr Gly Met Asp Tyr
 1 5 10

5
 <210> 13
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> AcMo 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

10
 Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

15
 <220>
 <223> AcMo VL 11E6 CDR-L1

<400> 14
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10

20
 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> AcMo VL 11E6 CDR-L2

25
 <400> 15
 Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

ES 2 579 554 T3

<210> 16
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

5

<220>
 < 223> AcMo VL 11E6 CDR-L3

<400> 16
 Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

10

<210> 17
 < 211> 120
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> AcMo VH 4E5

15

<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

20

<210> 18
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> AcMo VH 4E5 CDR-H1

<400> 18
 Asn Tyr Leu Ile Glu
 1 5

25

<210> 19
 < 211> 17

ES 2 579 554 T3

< 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> AcMo VH 4E5 CDR-H2

5 <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

10

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

<400> 20
 Ser Ala Gly Thr Ala Arg Ala Arg Phe Ala Tyr
 1 5 10

15

<210> 21
 < 211> 108
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

20

<220>
 < 223> AcMo 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

25

<210> 22
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> AcMo VL 4E5 CDR-L1

<400> 22
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser Leu Asn
 1 5 10

5
 <210> 23
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

10
 <220>
 < 223> AcMo VL 4E5 CDR-L2

<400> 23
 Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser
 1 5

15
 <210> 24
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> AcMo VL 4E5 CDR-L3

20
 <400> 24
 Leu Gln Tyr Ala Ser Phe Pro Phe Thr
 1 5

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

ES 2 579 554 T3

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 579 554 T3

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> 26
 < 211> 106
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 26
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 27
 < 211> 6276
 < 212>ADN
 < 213> Artificial

10

<220>
 < 223> Plásmido que codifica OmpA-[RAGE (23-340)]-6His

ES 2 579 554 T3

<400> 27
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcacct agcgcgccgt cctttcgctt tcttcacctc 120
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccacgcacct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggctatttgg 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 gaaaagccg 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 atcactcgca tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgcgt ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcгаа tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc 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 ttgaatatgg ctcataacac 1380
 cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccaactcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860

ES 2 579 554 T3

accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagett 1980
 ccaggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag 2040
 cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttctctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcttgcgcta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcggagaa cgaagagcg cctgatgcgg 2280
 tttttctcc ttacgcatct gtgcggattt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac ggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt tttcctgttt 2700
 ggtcaactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgtgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgcctcag gtcgcagacg ttttgacga 3060
 gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcaccc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgc gaaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctct cgcgaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taatgctgt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagcg gtttgcgtat 3600
 tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgccctca 3660
 ccgcctggcc ctgagagagt tgacgcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttgc gtatcgtcgt 3780
 atcccactac cgagatgtcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcatg 3840

ES 2 579 554 T3

cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcatt ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcggccg 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgcgt gtgaccaat gcgaccagat 4080
 gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaaat aatactggtg atgggtgtct 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
 catcctggtc atccagcggga tagttaatga tcagcccact gacgcggttc gcgagaagat 4260
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
 tggcacccgat ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
 gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
 ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccacgcgcgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
 tcgcagaaac gtggctggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
 ctcccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgtat gtgtccggga 4680
 tctcgcgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
 ccgttgagca ccgcccgccg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
 ccggccaacg ggcctgccac catacccaag ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
 cgagcccgat ctcccccac ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
 gcgcgcgtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatoga tctcgtatcc 4980
 gcgaaattaa tacgactcac tataggggaa ttgtgagcgg ataacaattc ccctctagaa 5040
 ataattttgt ttaactttaa gaaggagata tacatatgaa aaagacagct atcgcgattg 5100
 cagtggcact ggctggtttc gctaccgtag cgcaggccgc tcaaaacatc acagcccgga 5160
 ttggcgagcc actggtgctg aagtgtaaagg gggcccccga gaaaccacc cagcggctgg 5220
 aatggaaact gaacacaggc cggacagaag ctgtggaagg cctgtctccc cagggaggag 5280
 gcccctggga cagtgtggct cgtgtccttc ccaacggctc cctcttcctt ccggtgtcg 5340
 ggatccagga tgaggggatt ttccgggtcc aggcaatgaa caggaatgga aaggagacca 5400
 agtccaacta ccgagtcctg gtctaccaga ttctgggaa gccagaaatt gtagattctg 5460
 cctctgaact cacggctggt gttcccaata agtgggggac atgtgtgtca gagggaagct 5520
 accctgcagg gactcttagc tggcacttgg atgggaagcc cctggtgcct aatgagaagg 5580
 gagtatctgt gaaggaacag accaggagac accctgagac agggctcttc aactgcagt 5640
 cggagctaat ggtgacccca gccgggggag gagatccccg tcccacctc tcctgtagct 5700
 tcagcccagg ccttcccoga caccgggctc tgcgcacagc ccccatccag ccccggtct 5760

ES 2 579 554 T3

gggagcctgt gcctctggag gaggtccaat tgggtgtgga gccagaaggt ggagcagtag 5820
ctcctggtgg aaccgtaacc ctgacctgtg aagtcctgc ccagccctct cctcaaatcc 5880
actggatgaa ggatggtgtg cccttgcccc ttccccccag ccctgtgctg atcctccctg 5940
agatagggcc tcaggaccag ggaacctaca gctgtgtggc caccattcc agccacgggc 6000
cccaggaaaag ccgtgctgtc agcatcagca tcatcgaacc aggcgaggag gggccaactg 6060
caggctctgt gggaggatca gggctgggaa ctcaccacca ccaccaccac tgactcgagc 6120
accaccacca ccaccactga gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg 6180
ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccttg ggctctaaa cgggtcttga 6240
ggggtttttt gctgaaagga ggaactatat ccggat 6276

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

5

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

<400> 28
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcgcc agcgcgccgt ccttctgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc toccttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggc ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaatg 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 gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgctc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttccc gggatcgcag 1080
tgggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140

10

ES 2 579 554 T3

taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 tcgcacctga ttgcccagaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaac 1380
 cccttgatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaag atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggettccagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
 accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
 ccaggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag 2040
 cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg cttttgctc acatgttctt tcctgcgcta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc 2220
 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcaggaag cggagagcg cctgatgcgg 2280
 tattttctcc ttacgcctct gtgcggattt tcacaccgca tatatgggtc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacaact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac gggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt tttcctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcag ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccgtt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgcta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcatgagc atccggaaca taatggtgca gggcgtgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060

ES 2 579 554 T3

gcagtcgctt cacgttgcct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgata atgcgcaccc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggggggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggtcct cggcgaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcttat 3600
 tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgccctca 3660
 ccgctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct gtttgcccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccga ctcggtaatg gcgcgattg 3840
 cggccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcctcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcac ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtgccttcc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgcca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
 gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgctc 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aacgcccga cattaagtca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
 catcctggtc atccagcggga tagttaatga tcagcccact gacgcggtgc gcgagaagat 4260
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgctc taccatcgac accaccgc 4320
 tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
 gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgccgcc agttgttgtg 4440
 ccacgcgggtt gggaaatgta ttcagctccg 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 ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
 ccggtgagca ccgcccgcg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
 ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
 cgagcccgat cttcccctac ggtgatgtcg gcgatatagg ccgagcaac cgcacctgtg 4920
 gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
 aattaatacg actcactata ggggaattgt gacgggataa caattcccct ctagaataa 5040

ES 2 579 554 T3

ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
 agcagcggcc tgggtgccgc cggcagccat atgcaaaaaca tcacagcccg gattggcgag 5160
 ccaactggtgc tgaagtgtaa gggggccccc aagaaaccac cccagcggct ggaatggaaa 5220
 ctgaacacag gccggacaga agcttgggaag gtctctgtct cccagggagg aggccctgtg 5280
 gacagtgtgg ctctgtctct tcccaacggc tcctctctcc ttccggctgt cgggatccag 5340
 gatgagggga ttttccgggt ccaggcaatg aacaggaatg gaaaggagac caagtccaac 5400
 taccgagtcc gtgtctacca gattcctggg aagccagaaa ttgtagattc ttgactcgag 5460
 caccaccacc accaccactg agatccggct gctaacaaaag cccgaaagga agctgagttg 5520
 gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccttg ggcctctaa acgggtcttg 5580
 aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccgat 5617

<210> 29
 < 211> 5932
 < 212>ADN
 < 213> Artificial

5

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

<400> 29
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaaagcgc gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcggaa ccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 tcogctcatg 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
 agacttgctc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgtg ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020

10

ES 2 579 554 T3

tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag 1080
 tggtagtaaa ccatgcatca tcaggagtag ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
 taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 togcacotga ttgcccagaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgttgaatt taatcgccgc cttagacaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaac 1380
 cccttgatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatccctaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgctt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca cacttcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcget ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtctgtctt taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac 1860
 accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagc gtcggaacag gagagcgac gagggagctt 1980
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
 cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaaccg 2100
 gcctttttac ggttccctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgctgta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcaggaag cggagagcg cctgatcgcg 2280
 tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac gggcttgtct 2460
 gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt tttcctggtt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttctgta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgtgac ttcgcgctt ccagacttta 3000

ES 2 579 554 T3

cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgacgca 3060
 gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gacacgacgc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
 catgcggcgg ataataggcct gcttctcgcg gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctct cgccgaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcccc 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggetct caagggcacg ggtcgagatc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
 tgggcgccag ggtggttttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
 ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatgggtggt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
 cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcagc gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcac ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
 gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
 catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcggttc gcgagaagat 4260
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
 tggcaccagc ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
 gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
 ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccacgcgcgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
 tcgcagaaac gtggctggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccacctg aattgactct 4620
 ctccggggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
 tctcagcgtc ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
 ccgttgagca ccgcgcgcgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
 ccggccacgg ggccctgccac cataccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
 cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920

ES 2 579 554 T3

gcgccggtga tgccggccac gatgcgcccg gcgtagagga tcgagatctc gatccccgca 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcggcc tgggtcccgcg cggcagccat atgcaaaaca tcacagcccg gattggcgag 5160
ccactggtgc tgaagtgtaa gggggccccc aagaaaccac cccagcggct ggaatggaaa 5220
ctgaacacag gccggacaga agcttggaag gtcctgtctc cccagggagg aggccctggt 5280
gacagtgtgg ctctgtctct tcccaacggc tcctcttcc ttccggctgt cgggatccag 5340
gatgagggga ttttccggtg ccaggcaatg aacaggaaatg gaaaggagac caagtccaac 5400
taccgagtcc gtgtctacca gattcctggg aagccagaaa ttgtagattc tgcctctgaa 5460
ctcacggctg gtgttcccaa taagggtggg acatgtgtgt cagagggag ctaccctgca 5520
gggactctta gctggcactt ggatgggaag cccctggtgc ctaatgagaa gggagtatct 5580
gtgaaggaac agaccaggag acaccctgag acagggtctc tcacactgca gtcggagcta 5640
atggtgacct cagcccgggg aggagatccc cgtcccacct tctcctgtag cttcagccca 5700
ggccttcccc gacaccgggc cttgcgca caccccatcc agccccgtgt ctgggagcct 5760
gtgccttgac tcgagcacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga 5820
aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc ccttggggcc 5880
tctaaacggg tcttgagggg ttttttctgt aaaggaggaa ctatatccgg at 5932

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

5

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

<400> 30
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaaagcgc gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcggccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccttttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga cccccaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctatc 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

10

ES 2 579 554 T3

actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
 gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
 aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
 agacttgttc aacagggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
 cgttatctat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
 tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
 taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatctata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgttggcaat taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaac 1380
 cccttgatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actccttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgccttcta gtgtagcctg agttaggcca ccaactcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
 accgaactga gatacctaca gcgtgageta tgagaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
 cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ctttttctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcggcgc 2220
 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
 tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggcgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgcccgcac acccgccaac acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580

ES 2 579 554 T3

gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atcccggtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggg tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatgggtgca gggcgtgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgacgca 3060
 gcagtcgctt cacttccgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggtcct cgcggaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggtct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgcta 3480
 atgagtgagc taacttacat taatgctgt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgctat 3600
 tgggcgccag ggtggttttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgccctca 3660
 ccgcctggcc ctgagagagt tgacgcaagc ggtccacgct ggtttgccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcctcg gtatcgtcgt 3780
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgattg 3840
 cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcgagt gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgta 3960
 tcggctgaat ttgattgca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
 gctccaogcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aacccggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
 catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccagc 4320
 tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgcccgcac aatttgacgac ggcgcgtgca 4380
 gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgc agttgttgtg 4440
 ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
 tcgcagaaac gtgctggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560

ES 2 579 554 T3

catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac cataccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgctccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcggcc tgggtcccgcg cggcagccat atgcaaaaca tcacagcccg gattggcgag 5160
ccactggtgc tgaagtgtaa gggggccccc aagaaaccac cccagcggct ggaatggaaa 5220
ctgaacacag gccggacaga agcttgggaag gtccctgtctc cccagggagg aggcccttgg 5280
gacagtgtgg ctctgtctct tcccaacggc tcctcttcc ttccggctgt cgggatccag 5340
gatgagggga ttttccgggtg ccaggcaatg aacaggaatg gaaaggagac caagtccaac 5400
taccgagtcc gtgtctacca gattcctggg aagccagaaa ttgtagattc tgcctctgaa 5460
ctcacggctg gtgttcccaa taaggtgggg acatgtgtgt cagaggggag ctaccctgca 5520
gggactctta gctggcactt ggatgggaag cccctggtgc ctaatgagaa gggagtatct 5580
gtgaagggaa agaccaggag acaccctgag acagggctct tcacactgca gtcggagcta 5640
atggtgacct cagcccgggg aggagatccc cgtcccacct tctcctgtag cttcagccca 5700
ggccttcccc gacaccgggc cttgcgcaca gccccatcc agccccgtgt ctgggagcct 5760
gtgcctctgg aggaggtcca attggtggtg gagccagaag gtggagcagt agctcctggt 5820
ggaaccgtaa ccctgacctg tgaagtccct gcccagccct ctctcaaat ccaactggatg 5880
aaggatggtg tgcccttgcc ccttcccccc agccctgtgc tgatcctccc tgagataggg 5940
cctcaggacc agggaaccta cagctgtgtg gccaccatt ccagccacgg gccccaggaa 6000
agccgtgctg tcagcatcag catcatcgaa ccaggcgagg aggggccaac tgcaggctct 6060
gtgggaggat catgactcga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgctaacaaa 6120
gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt 6180
ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggat 6238

<210> 31
< 211> 5614
< 212>ADN
< 213> Artificial

5

<220>
< 223> Plásmido que codifica 6His-(Thr)-[RAGE (130-234)]

ES 2 579 554 T3

<400> 31
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcacct agcgcgccct cctttcgctt tcttcccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga cccccaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccctcgcctt gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg agctgattta 420
 aaaaaaattt 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 gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
 agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcaactcga tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgcgt ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcga tgcacccggc gcaggaacac tgccagcga tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
 tgggtgagtaa ccattgcatc 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 cttagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaacac 1380
 cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac ccogtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaacaaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
 aactctgtag caaccgctac atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac 1860
 accgaactga gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920

ES 2 579 554 T3

aagggcgaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgattht tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctthttac ggttcctggc cthtttgetgg cctthttgctc acatgthtct tcctgcgtha 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctthtgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcggaggaag cggagagcg cctgatgcgg 2280
tathttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgcccga tagttaagcc agtatacaact ccgetatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gthtttaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gthttctccag 2640
aagcgtaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtha agggcgtht thtctgtht 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggthaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccgtt tactggaacg 2820
thgtgaggtt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtha atacagatgt agtgthtcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac thccgcgtht ccagacttha 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg thttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgthcgtc cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgc gaaacgtht gtggcgggac cagtgcgaa 3240
ggcttgagcg agggcgthca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcgtcct cgcgaaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagthtcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagthcatgc cccgcgccc 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcac ggtcgagac ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacct taatgctgt gcgctcactg cccgctthcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gthtgcgth 3600
tgggcgccag ggtgththt cthttcacca gtgagacgg caacagctga thgcccthca 3660
ccgctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct gthttgccc agcaggcgaa 3720
aatcctgtht gatgthgtht aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gthctcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccga ctcgthaatg gcgcgctt 3840

ES 2 579 554 T3

cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaaacgatg ccctcattca 3900
gcatlgtcat gglttgltga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatltgctg gtgaccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcggttc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgctc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcaccagc ttgatcggcg cgagatttaa tcgcccgac aatltgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgccgcc agttgtgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccacgcgcgc ttcactttt tccgcgctt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgc 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggtlttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgcgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgcgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttcccccac ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaaataa 5040
ttltgtltaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat atggcctctg aactcacggc tgggtgtccc 5160
aataaggtgg ggacatgtgt gtcagaggga agctaccctg cagggactct tagctggcac 5220
ttggatggga agcccctggt gcctaagtag aaggagatct ctgtgaagga acagaccagg 5280
agacaccctg agacaggct cttcacactg cagtcggagc taatggtgac cccagcccgg 5340
ggaggagatc cccgtcccac cttctcctgt agcttcagcc caggccttcc ccgacaccgg 5400
gccttgcgca cagcccccat ccagccccgt gtctgggagc ctgtgccttg actcgagcac 5460
caccaccacc accactgaga tccggctgct aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct 5520
gctgccaccg ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg 5580
ggtttttgc tgaaaggagg aactatatcc ggat 5614

<210> 32
< 211> 5920
< 212>ADN
< 213> Artificial

5

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

ES 2 579 554 T3

<400> 32
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcacct agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 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 tcggtctgcg attccgactc 720
 gtccaacatc aatacaacct attaatTTTc cctcgtcaaa aataaggTTa tcaagtgaga 780
 aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
 agacttgTtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcaactgca tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgTTTTcccg gggatcgcag 1080
 tggTgagTaa ccatgcatca tcaggagTac ggataaaatg cttgatggTc ggaagaggca 1140
 taaattccgt cagccagTtt agTctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag occatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgTtTgaaTt taatcgccgc ctagagcaag acgTttcccg ttgaaatagT ctcataacac 1380
 ccctTgtatt actgTttatg taagcagaca gTttTattgt tcatgaccaa aatccctTaa 1440
 cgtgagTttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttctTga 1500
 gatcctTTTT ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggTttgtt tgccggatca agagctacca actctTTTTc cgaaggTaac tggttccagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtcctteta gtgtagccgt agTtaggcca ccacttcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatac tgttaccagT ggctgctgcc 1740
 agTggcgata agTcgtgtct tacccggTtg gactcaagac gatagTtacc ggataaggcg 1800

ES 2 579 554 T3

cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
 accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
 cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgta 2160
 tccccgtatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcggcg 2220
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcgaggaag cggagagcg cctgatgcgg 2280
 tttttctcc ttacgcactc gtgcggatatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
 gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggcctatgta agggcggttt tttcctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcag ggggtaatga tacogatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttctgta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatgggtgca gggcgtgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgcctcag gtcgcagacg ttttgacga 3060
 gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa tacgcgaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctct cggcgaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taatgctgt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagcg gtttgcgtat 3600
 tgggcgcccag ggtggttttt cttttacca gtgagacggg caacagctga ttgccctca 3660
 ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcctcg gtatcgtcgt 3780

ES 2 579 554 T3

atccccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgcgcg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgaccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccgga cattagtca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcggttc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgcgcg ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac ttggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccggcgc ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgcgcg aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgc caacagtccc 4800
ccggccaacgg gcctgccac catacccaac cggaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat ctccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
gcgcgcggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcaactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctgaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat atggcctctg aactcacggc tgggtttccc 5160
aataaggtgg ggacatgtgt gtcagagggg agetaccctg cagggactct tagctggcac 5220
ttggatggga agcccctggt gcctaatagag aagggagtat ctgtgaagga acagaccagg 5280
agacaccctg agacagggct cttcacactg cagtcggagc taatggtgac cccagcccgg 5340
ggaggagatc cccgtcccac cttctcctgt agcttcagcc caggccttcc ccgacaccgg 5400
gccttgcgca cagcccccat ccagcccgt gtctgggagc ctgtgcctct ggaggaggtc 5460
caattggtgg tggagccaga aggtggagca gtagctcctg gtggaaccgt aaccctgacc 5520
tgtgaagtcc ctgcccagcc ctctcctcaa atccactgga tgaaggatgg tgtgcccttg 5580
cccctcccc ccagccctgt gctgatctc cctgagatag ggcctcagga ccaggggaacc 5640
tacagctgtg tggccacca ttccagccac gggccccagg aaagccgtgc tgtcagcatc 5700
agcatcatcg aaccaggcga ggaggggcca actgcaggct ctgtgggagg atcatgactc 5760
gagcaccacc accaccacca ctgagatccg gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag 5820
ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc 5880
ttgaggggtt ttttctgaa aggaggaact atatccggat 5920

<210> 33
<211> 5605

ES 2 579 554 T3

< 212>ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Plásmido que codifica 6His-(Thr)-[RAGE (235-336)]

5

<400> 33
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcacct agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc 120
 ctttctcgcg acgttcgcgc gctttcccg tcaagctcta aatcgggggc toccttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaatagt ggactccttg tccaaaactg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 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 tcggtctgcg attccgactc 720
 gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
 aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
 agacttgctc aacagccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
 aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc 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 ttgaatatgg ctcataacac 1380
 cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440

ES 2 579 554 T3

cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgctt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgtt ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
 accgaaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gaggagctt 1980
 ccaggggaa acgcctggtt tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
 cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgctgta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
 agccgaaacta ccgagcgcag cgagtcagtg agcggaggaag cggagagcg cctgatgcgg 2280
 tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatgggta actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgtgac gcgcccctgac gggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggctc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggcctatgta agggcggttt tttcctgttt 2700
 ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggtatgatg gcggcgggac cagagaaaaa tactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt agtggttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatgggca gggcgtgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgagca 3060
 gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcaccc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataattggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacagggcca tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctct cgcgaaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360

ES 2 579 554 T3

gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcccc 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcttat 3600
tgggcgcagc ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcgagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcac ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttcgccta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgcgggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcggttc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcaccagc ttgatcggcg cgagatttaa tcgcccgcac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggcccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttcactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtgctgggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcagcgtc ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgcccgcgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttcccctc ggtgatgtcg gcgatatagg cccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgcccgtga tgcccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaaataa 5040
ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac 5100
agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat atgctggagg aggtccaatt ggtggtggag 5160
ccagaagggt gagcagtagc tcctggtgga accgtaacct tgacctgtga agtcccctgc 5220
cagccctctc ctcaaatcca ctggatgaag gatggtgtgc ccttgcccct tccccccagc 5280
cctgtgctga tcctccctga gatagggcct caggaccagg gaacctacag ctgtgtggcc 5340

accatttcca gccacgggcc ccaggaaagc cgtgctgtca gcatcagcat catcgaacca 5400
ggcgaggagg ggccaactgc aggctctgtg ggaggatcat gactcgagca ccaccaccac 5460
caccactgag atccggctgc taacaaagcc cgaaaggaag ctgagttggc tgctgccacc 5520
gctgagcaat aactagcata accccttggg gcctctaaac gggctctgag gggttttttg 5580
ctgaaaggag gaactatata cggat 5605

ES 2 579 554 T3

<210> 34
 < 211> 345
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

5

<220>
 < 223> Proteína RAGE nº 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

Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu
          35          40          45

Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser
          50          55          60

Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn
65          70          75          80

Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe
          85          90          95

Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr
          100          105          110

Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser
          115          120          125

Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val
          130          135          140

Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly
145          150          155          160

Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr
          165          170          175
    
```

ES 2 579 554 T3

Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met
180 185 190

Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile
210 215 220

Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val
225 230 235 240

Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu
245 250 255

Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys
260 265 270

Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro
275 280 285

Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His
290 295 300

Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile
305 310 315 320

Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly
325 330 335

Leu Gly Thr His His His His His His
340 345

<210> 35
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Proteína RAGE nº 2

<400> 35
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

10

ES 2 579 554 T3

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

5

<220>
< 223> Proteína RAGE nº 3

<400> 36
Met Gly Ser Ser 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 Ala
115 120 125

10

Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser

ES 2 579 554 T3

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

5

<220>
<223> Proteína RAGE nº 4

<400> 37
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

10

ES 2 579 554 T3

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 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 nº 5

ES 2 579 554 T3

<400> 38

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 nº 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

5

10

ES 2 579 554 T3

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

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

5

<220>
 <223> Proteína RAGE nº 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

10

Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro

ES 2 579 554 T3

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

5

<400> 42

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

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

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

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

ES 2 579 554 T3

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

ES 2 579 554 T3

<220>
< 223> VH7-4.1/JH6 FR1

<400> 43
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

5 <210> 44
< 211> 14
< 212> PRT
< 213> Artificial

10 <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

15 <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

20 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

25 <220>
< 223> VH7-4.1/JH6 FR4

<400> 46
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30 <210> 47
< 211> 30
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> VH1-2/JH6 FR1

ES 2 579 554 T3

<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

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

ES 2 579 554 T3

<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

5

<220>

< 223> 1-12/L5/JK2 FR4

<400> 52

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

10

<210> 53

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> Artificial

15

<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

20

<210> 54

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> 3-15/L2/JK2 FR2

25

<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

30

<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

ES 2 579 554 T3

<210> 56
< 211> 120
< 212> PRT
< 213> Artificial

5

<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

10

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

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

ES 2 579 554 T3

<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

5

<220>

<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
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> 59

<211> 108

10

ES 2 579 554 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 11E6.2-GL

5

<400> 59

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val 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 Glu 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

<210> 60
<211> 404
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 60

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

ES 2 579 554 T3

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

ES 2 579 554 T3

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 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 de RAGE

<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

5

ES 2 579 554 T3

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 2 579 554 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

5

<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

10

ES 2 579 554 T3

< 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> VL h11E6.2

5

<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

10

<220>
 < 223> VL h11E6.3

<400> 65

15

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

ES 2 579 554 T3

<210> 66
 < 211> 108
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

5

<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
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

10

<210> 67
 < 211> 120
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> VH h11E6.5

ES 2 579 554 T3

<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

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

5

<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

10

ES 2 579 554 T3

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

5

<220>
 < 223> VH h11E6.13

<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

10

<210> 70
 < 211> 31
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> NtermR31

15

<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

20

<210> 71
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Péptido 1

ES 2 579 554 T3

<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

<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

ES 2 579 554 T3

<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

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

ES 2 579 554 T3

<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

<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 Cys Thr Cys Ala Gly Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr
20 25 30

<210> 83

< 211> 31

< 212>ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador de PCR

ES 2 579 554 T3

<400> 83
agtaacggcc gccagtgtgc tggaattcgg a 31

5 <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

10 Thr Thr Gly Gly Cys Cys Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Gly Cys Cys
20 25 30

<210> 85
< 211> 36
< 212>ADN
< 213> Artificial

15 <220>
< 223> Cebador de PCR

<400> 85
cgaagcttga tgaacaggaa tggaaaggag accaag 36

20 <210> 86
< 211> 34
< 212>ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador de PCR

25 <400> 86
tctcagagca cctgcagttg gccctcctc gcct 34

30 <210> 87
< 211> 27
< 212>ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador de PCR

<400> 87
gcacatggc agccgaaca gcagttg 27

35 <210> 88
< 211> 29
< 212>ADN
< 213> Artificial

40 <220>
< 223> Cebador de PCR

ES 2 579 554 T3

<400> 88
 gagtctcgag gcagaatcta caatttctg 29

5
 <210> 89
 < 211> 90
 < 212>ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cebador de PCR

<400> 89
 atgctacata tgaaaaagac agctatcgcg attgcagtgg cactggctgg tttcgtacc 60

10
 gtagcgcagg ccgctcaaaa catcacagcc 90

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

15
 <220>
 < 223> Cebador de PCR

<400> 90
 atgctactcg agtcagtggg ggtgggtggg gtgagttccc agccctgatc ctcccacaga 60

gctcgcagtt ggcccctcc 79

20
 <210> 91
 < 211> 42
 < 212>ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cebador de PCR

25
 <400> 91
 gtacgatc gagggacgaa tggatccacc gtgccagca cc 42

30
 <210> 92
 < 211> 32
 < 212>ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cebador de PCR

<400> 92
 ctagtctaga tcattacc ggagacagg ag 32

35
 <210> 93
 < 211> 42
 < 212>ADN
 < 213> Artificial

40
 <220>
 < 223> Cebador de PCR

<400> 93
 gtacgatc gagggacgaa tggatccacc gtgccagca cc 42

ES 2 579 554 T3

<210> 94
< 211> 32
< 212>ADN
< 213> Artificial

5

<220>
< 223> Cebador de PCR

<400> 94
ctagtctaga tcattaccc ggagacaggg ag 32

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que comprende un dominio de unión a antígeno, siendo dicho anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de una molécula de RAGE humano, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno:
- 5 un conjunto de CDRs de cadena pesada de SEQ ID NO: 10, 11 y 12 para CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada, respectivamente, y
- un conjunto de CDRs de cadena ligera de SEQ ID NO: 14, 15 y 16 para CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera, respectivamente.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 13.
3. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada seleccionado a partir de SEQ ID NO: 56 y 57; y/o al menos un dominio variable de cadena ligera seleccionado a partir de SEQ ID NO: 58 y 59.
4. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste en:
- 15 a) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:56 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:58;
- b) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:57 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:59;
- 20 c) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:62 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:63;
- d) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:62 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:64;
- 25 e) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:62 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:65;
- f) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:62 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:66;
- g) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:63; y
- 30 h) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:64;
- i) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:65;
- 35 j) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:67 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:66;
- k) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:68 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:63;
- l) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:68 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:64;
- 40 m) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:68 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:65;
- n) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:68 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:66
- 45 o) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:63;
- p) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:64;

- q) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:65;
- r) un anticuerpo con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:69 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:66.
- 5 5. Un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
6. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado según la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora que comprende un vector según la reivindicación 6.
- 10 8. Un método para producir un anticuerpo capaz de unirse a RAGE, que comprende cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 7, en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir un anticuerpo capaz de unirse a RAGE.
9. Una composición para la liberación de un anticuerpo comprendiendo dicha composición
- (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 a 4, en forma cristalizada como ingrediente; y
- 15 (b) al menos un vehículo polimérico.
10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en medicina.
12. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en el tratamiento de un mamífero.
- 20 13. El anticuerpo para uso según la reivindicación 12, en donde el uso es para el tratamiento de enfermedades neurológicas seleccionadas a partir del grupo que comprende esclerosis lateral amiotrófica, lesión del plexo braquial, lesión cerebral que incluye lesión cerebral traumática, parálisis cerebral, ataxia de Friedrich, Guillain Barré, leucodistrofias, esclerosis múltiple, postpolio, espina bífida, lesión de la médula espinal, atrofia muscular espinal, tumores espinales, ictus, mielitis transversa, demencia, demencia senil, deterioro cognitivo leve, demencia
- 25 relacionada con Alzheimer, corea de Huntington, discinesia tardía, hipercinesias, manías, enfermedad de Parkinson, síndrome de Steele-Richardson, síndrome de Down, miastenia grave, traumatismo nervioso, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Friedrich, trastorno de confusión aguda, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, nefropatía diabética, sepsis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias relacionadas.
- 30 14. El anticuerpo para uso según la reivindicación 12, en donde el uso es para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

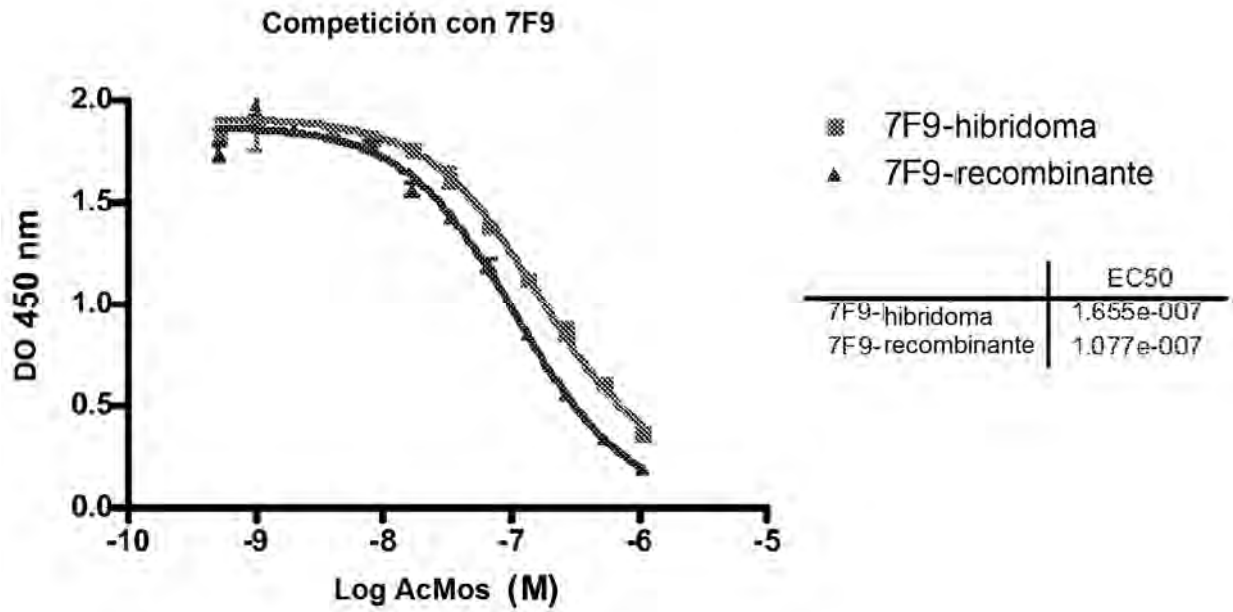


Fig. 1A

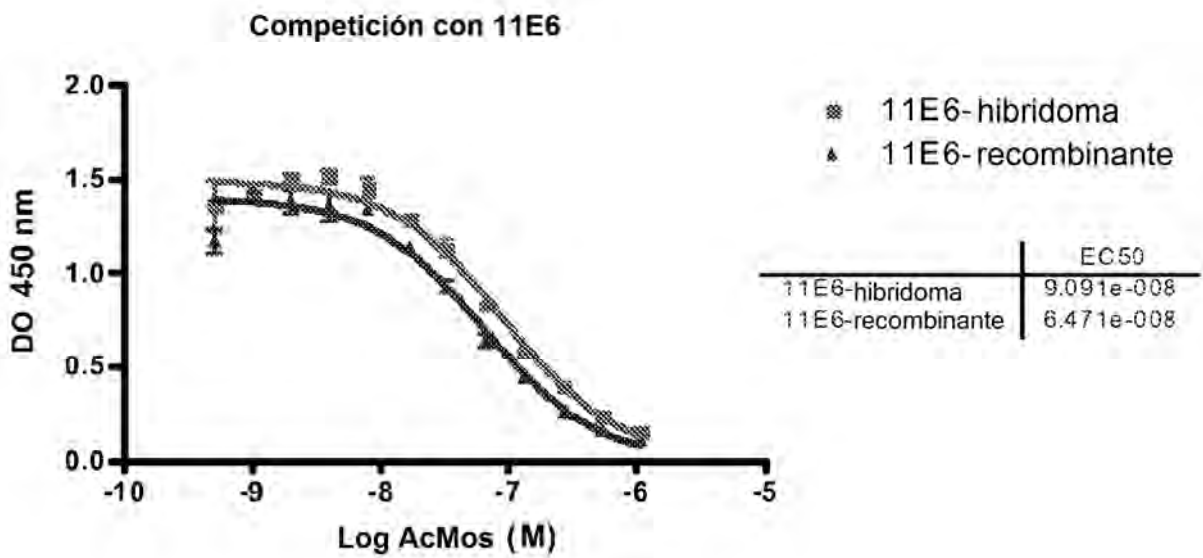


Fig. 1B

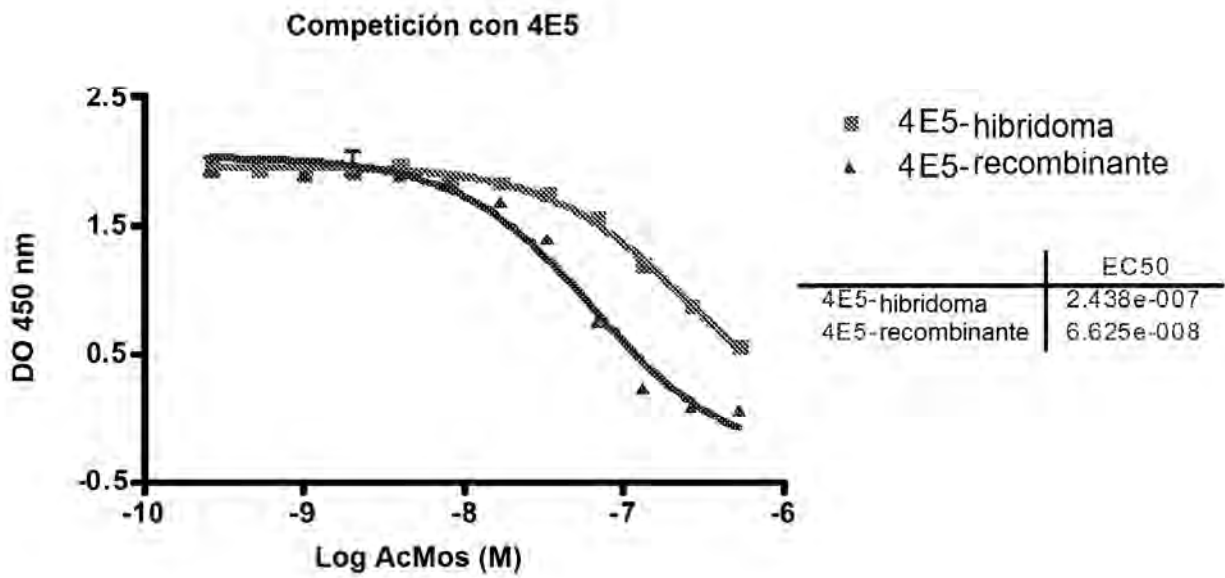


Fig. 1C

1-10 Péptidos 1-10

11,12 sRAGE

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12

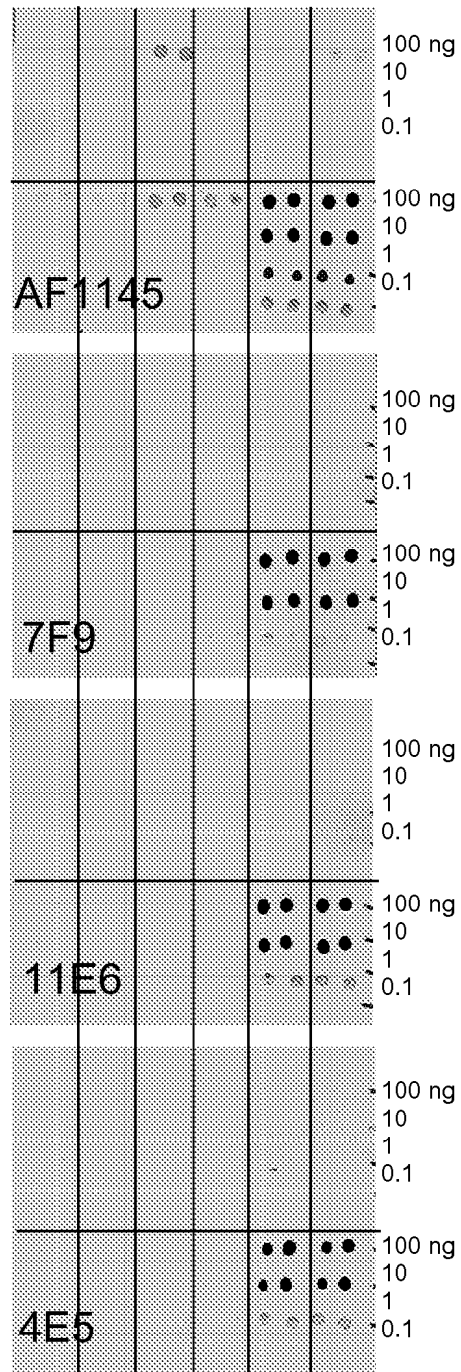


Fig. 2

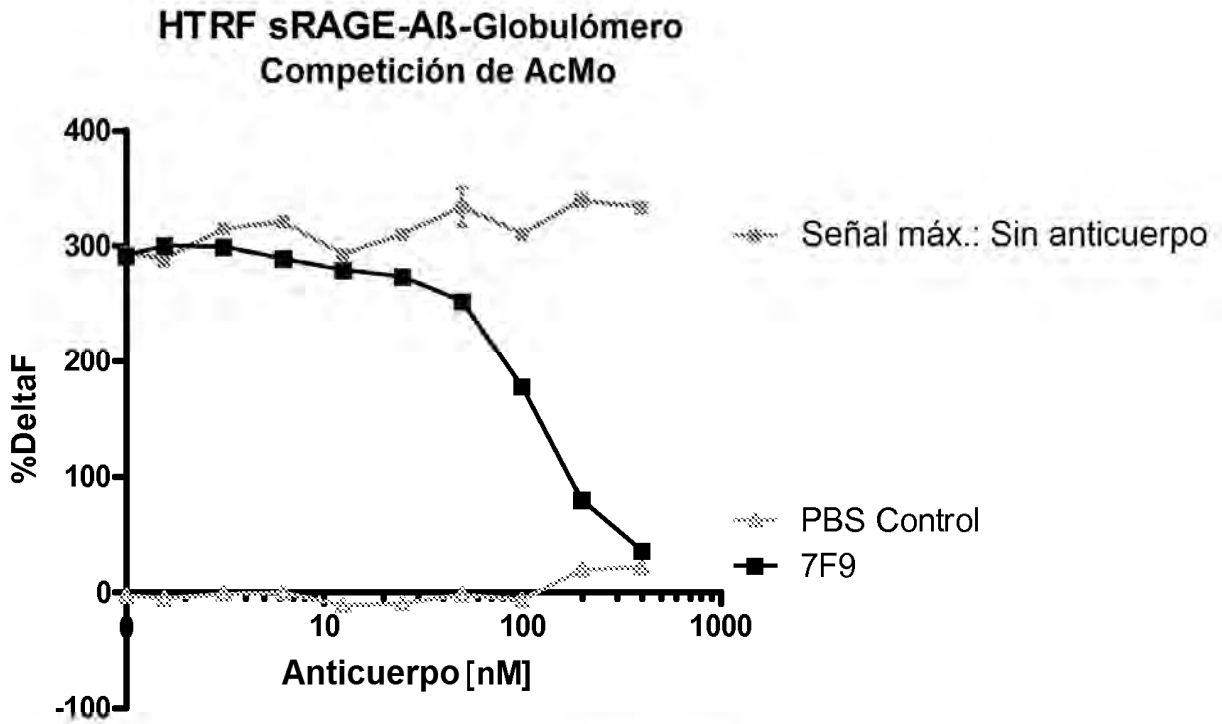


Fig. 3A

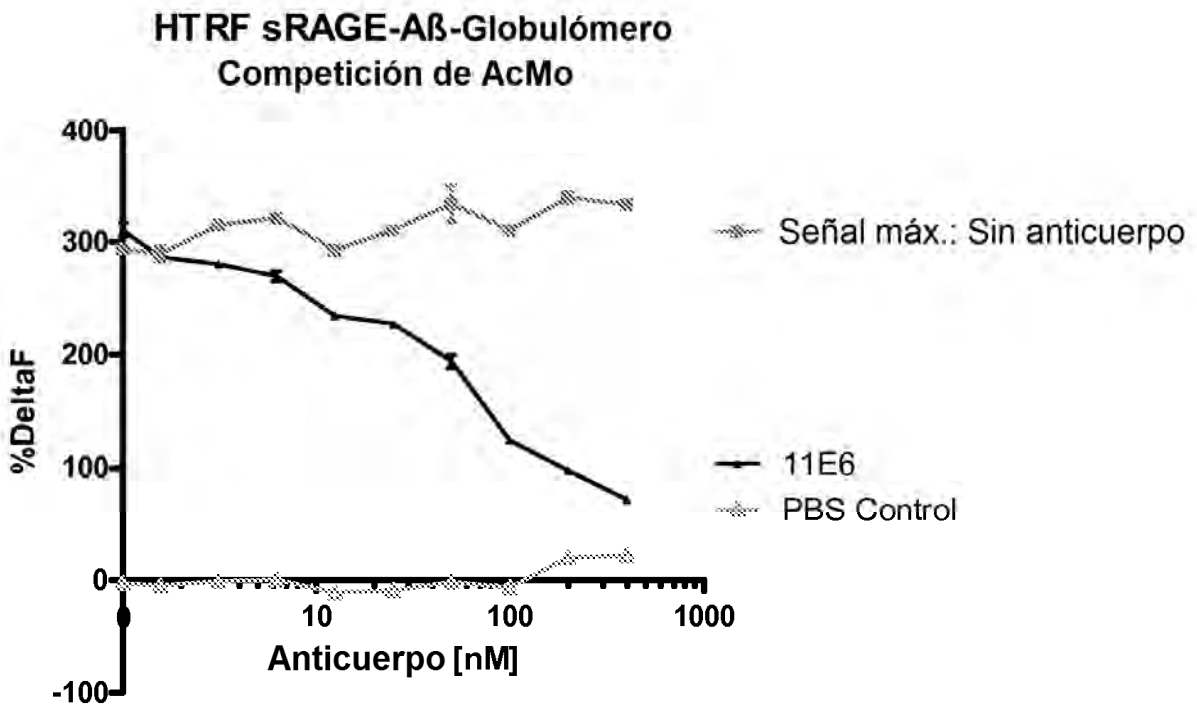


Fig. 3B

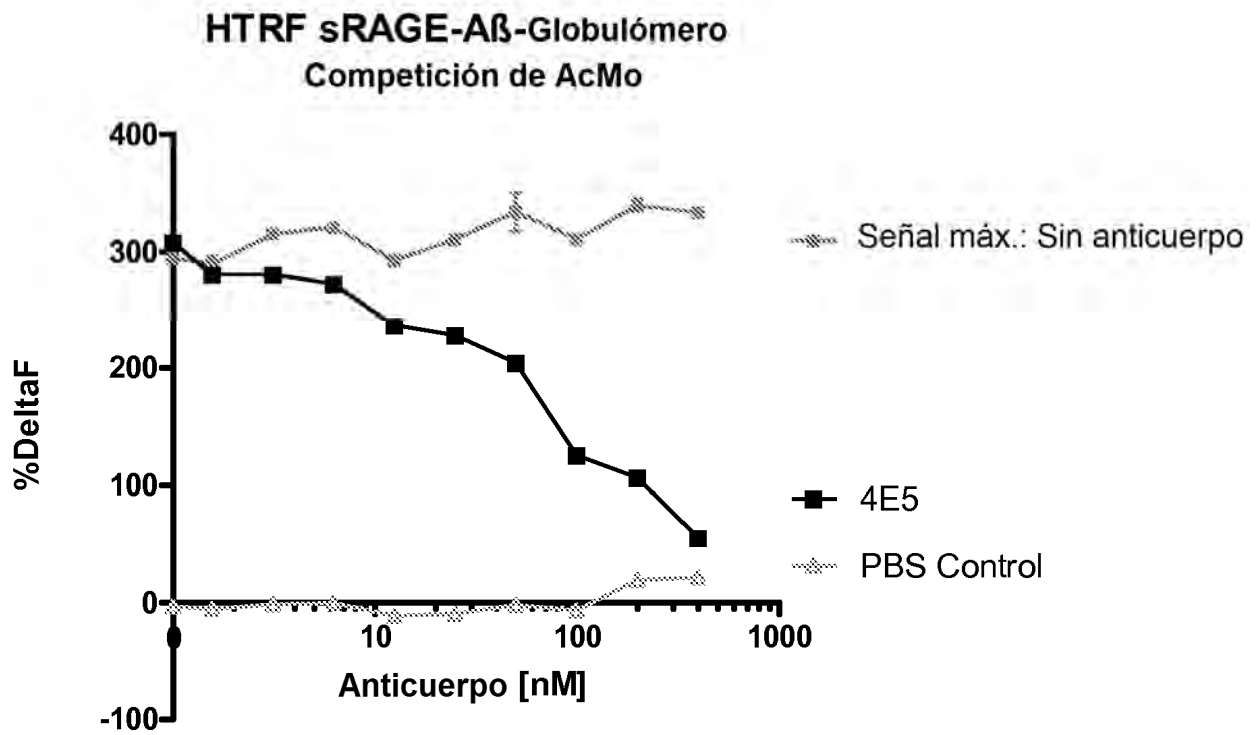


Fig. 3C

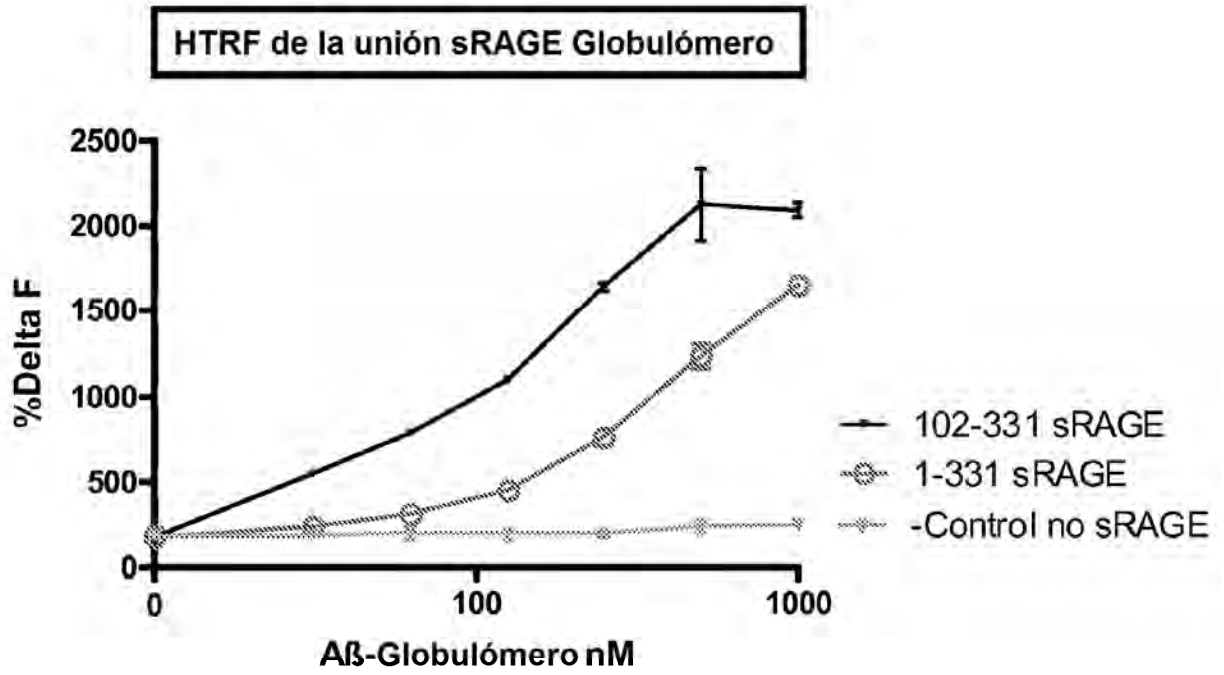


Fig. 4

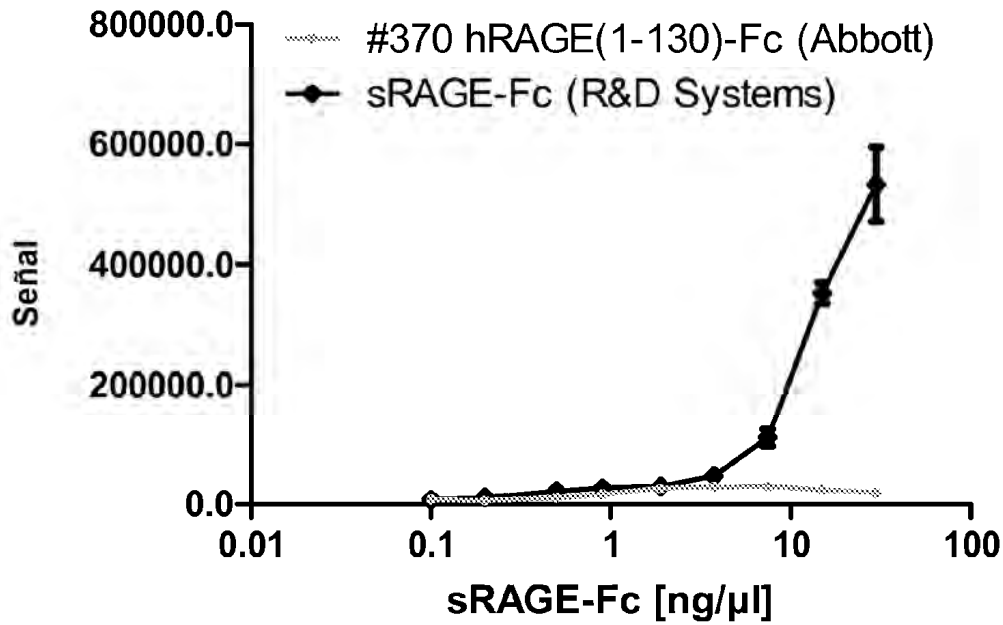


Fig. 5

RAGE 24-129 (E.coli, D#1474) con 3 AcMos anti-RAGE

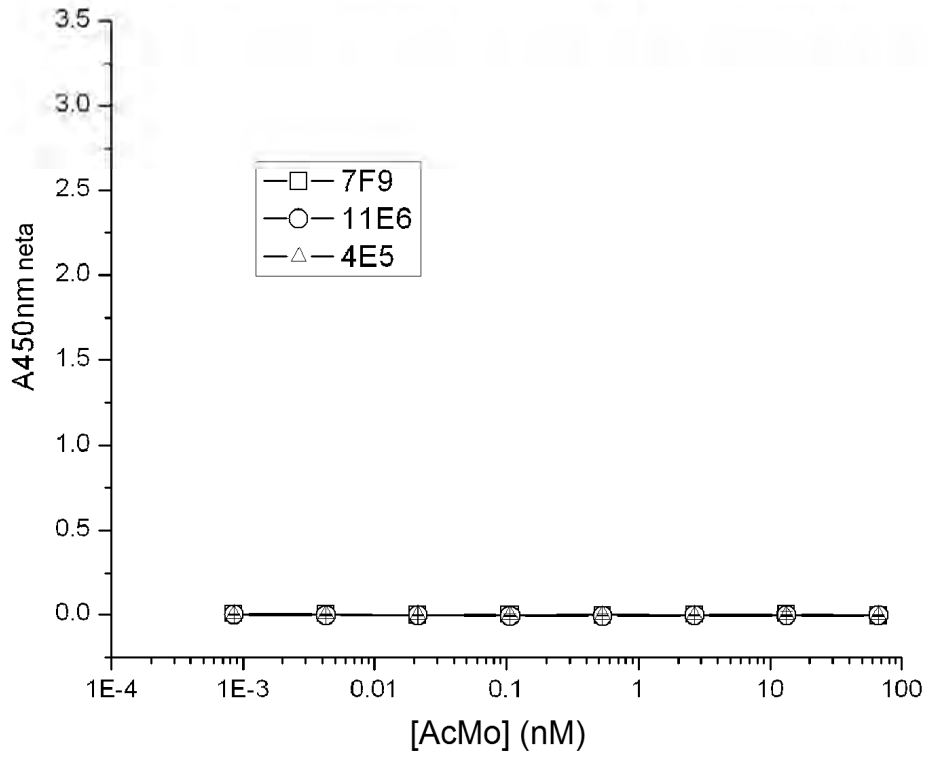


Fig. 6A

RAGE 24-234 (E.coli, D#1475) con 3 AcMos anti-RAGE

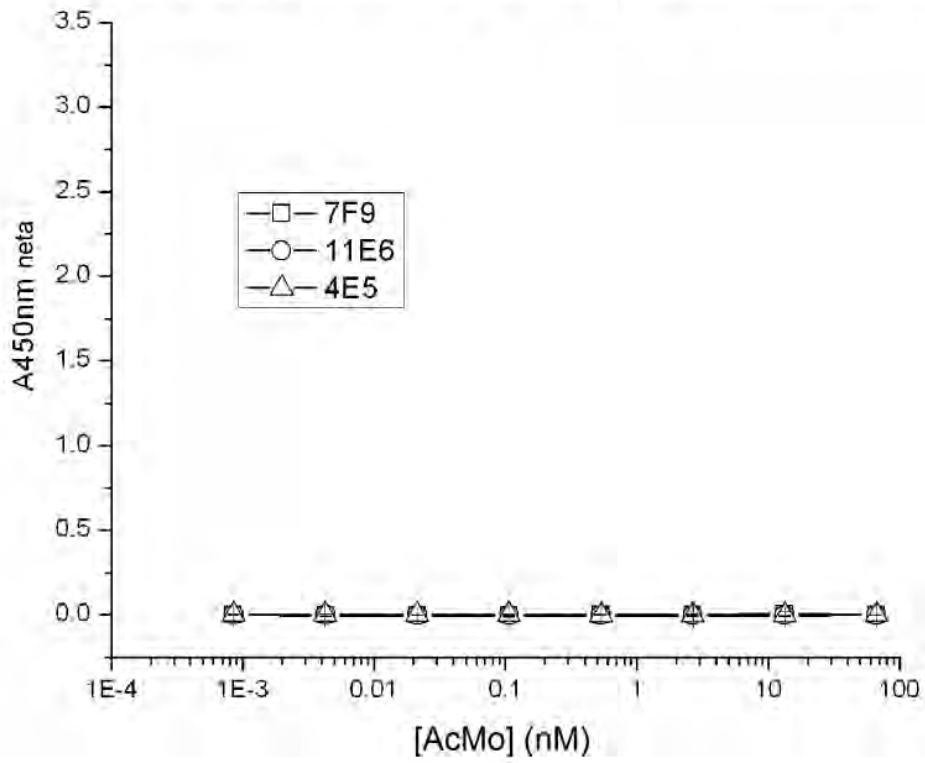


Fig. 6B

RAGE 130-234 (E.coli, D#1477) con 3 AcMos anti-RAGE

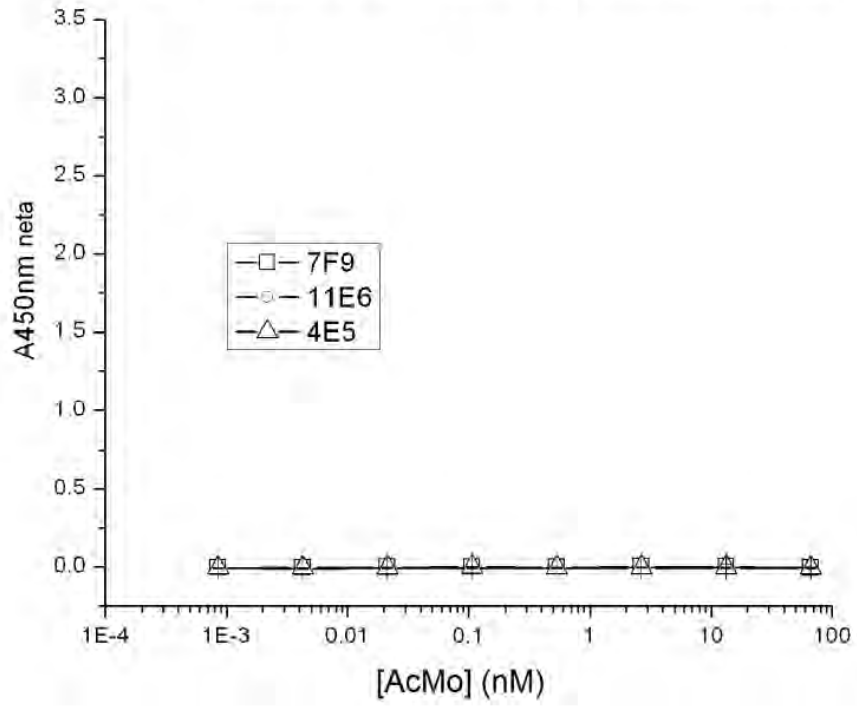


Fig. 6C

RAGE 24-336 (E. coli, D#1476) con 3 AcMos anti-RAGE

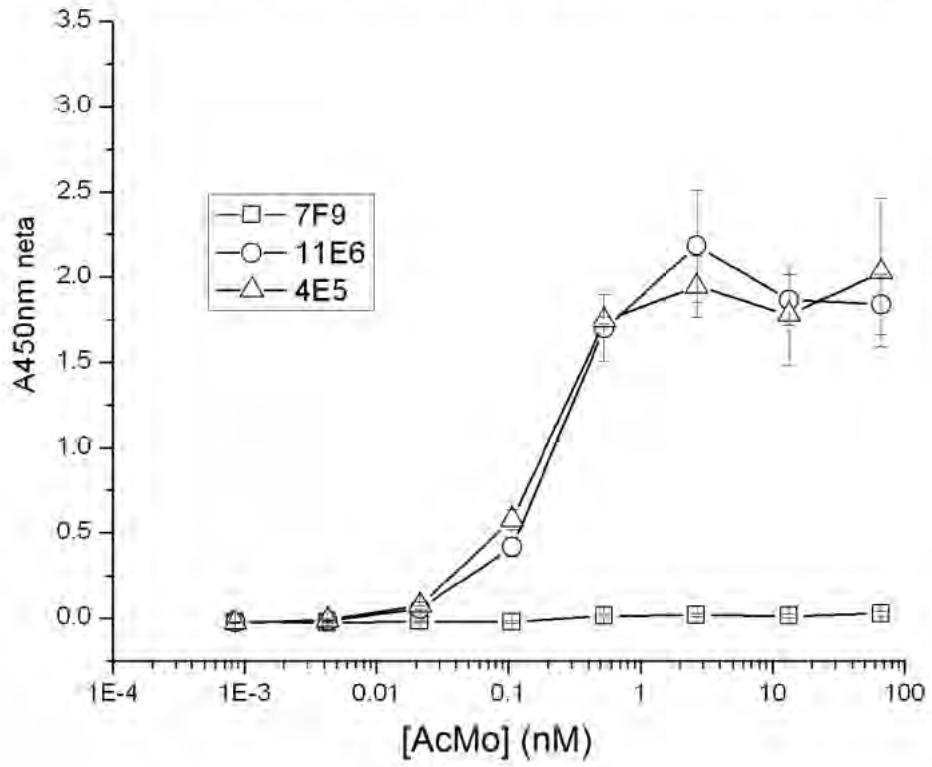


Fig. 7A

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

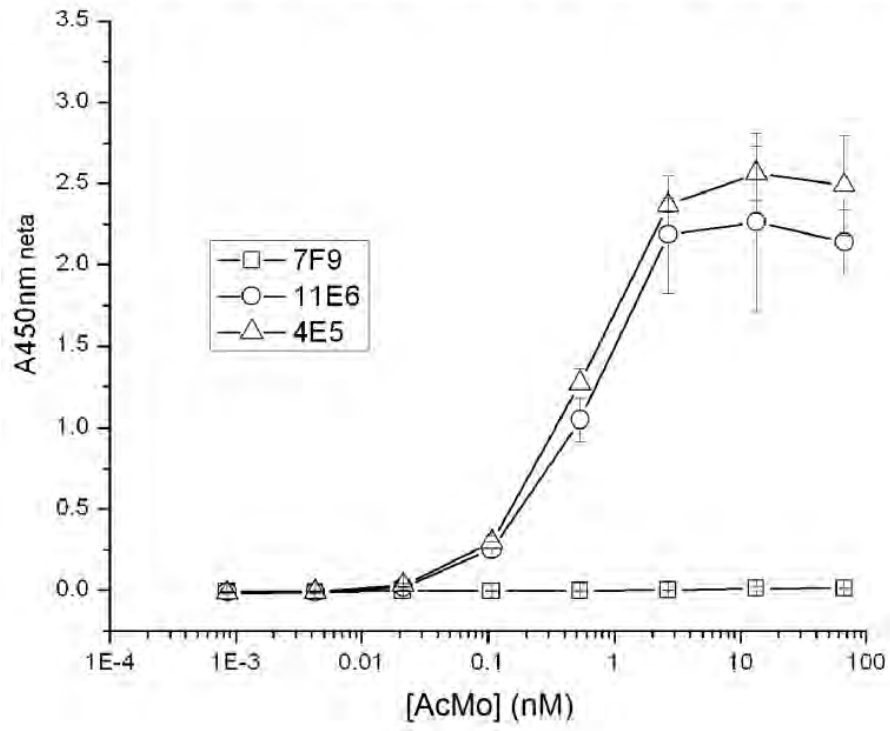


Fig. 7B

RAGE 235-336 (E.coli, D#1479) con 3 AcMos anti-RAGE

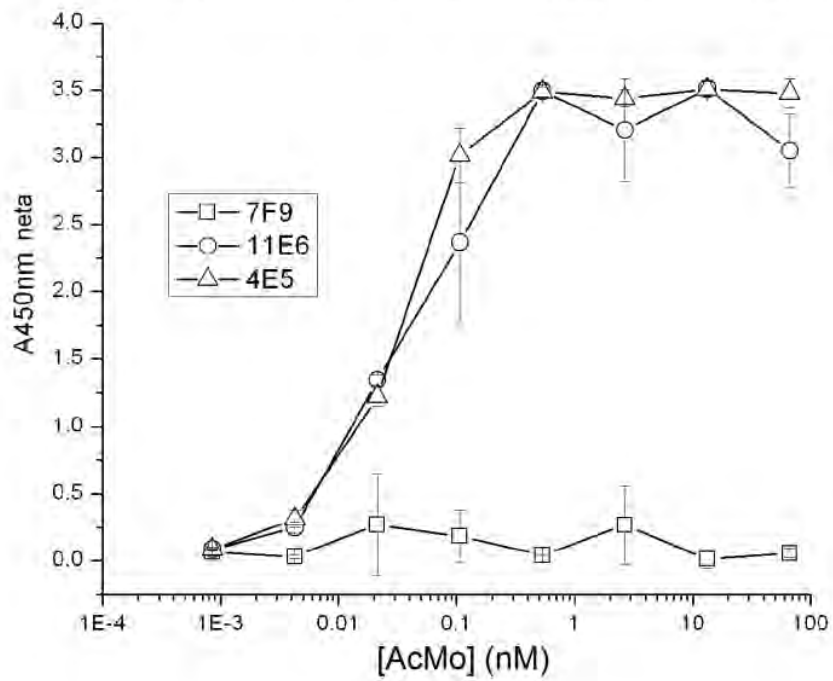


Fig. 7C

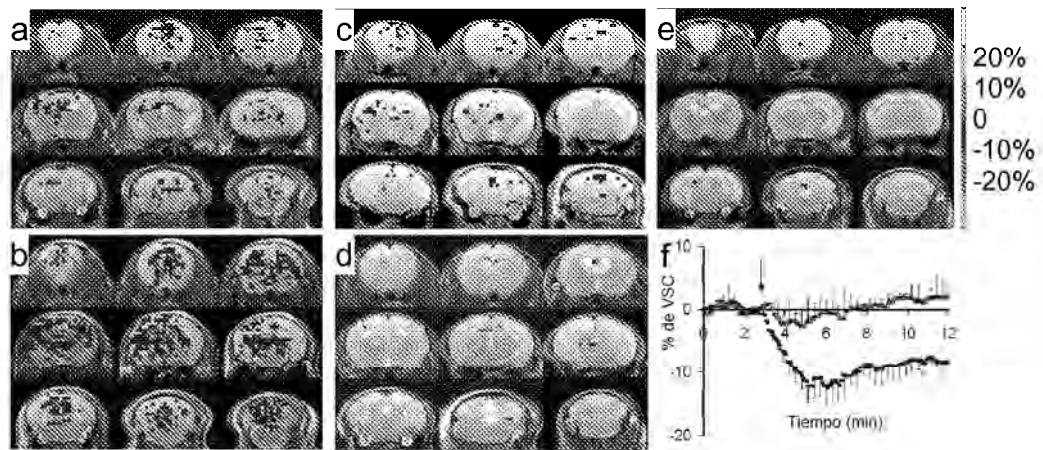


Fig. 8

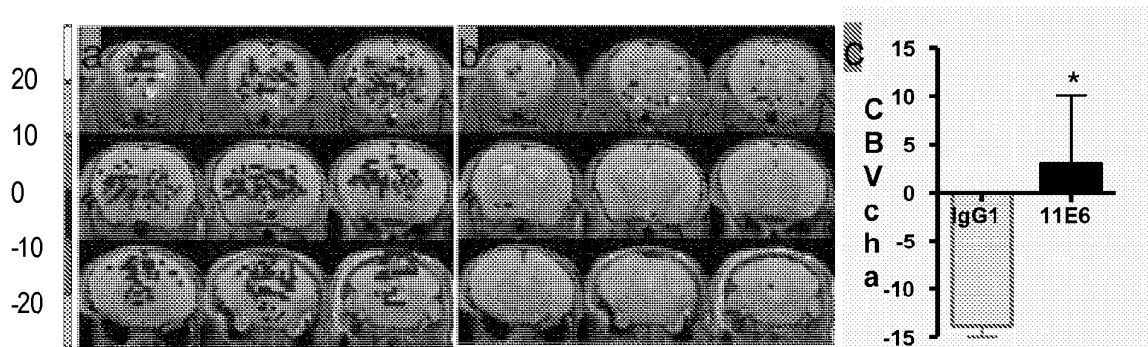


Fig. 9

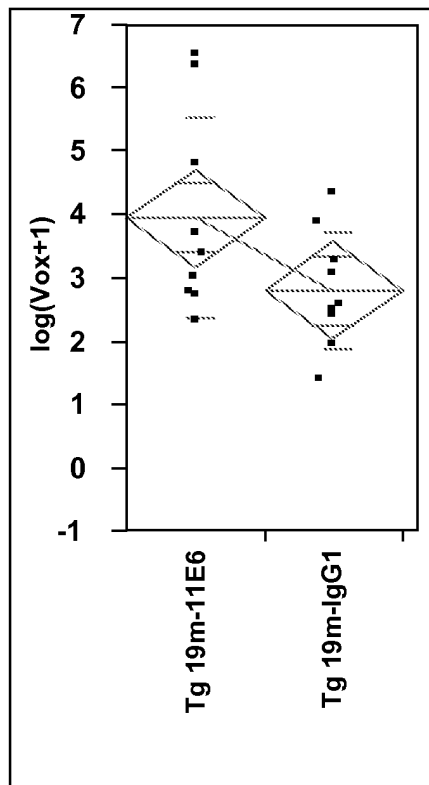
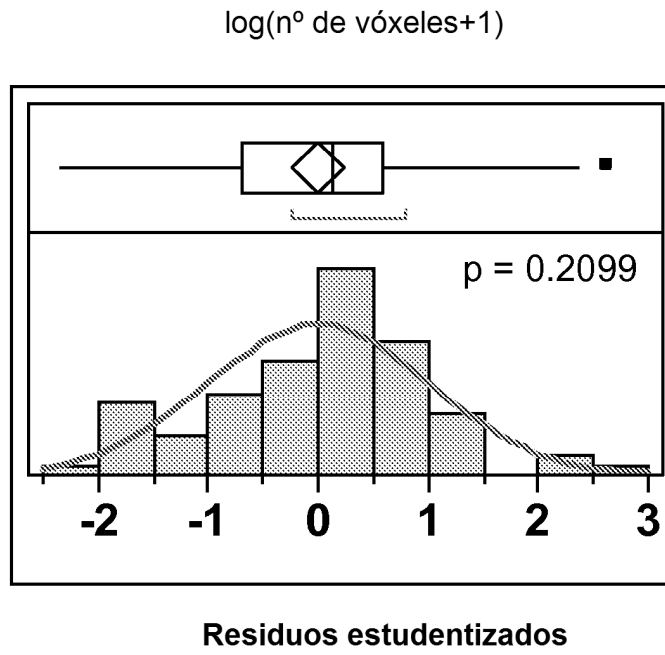
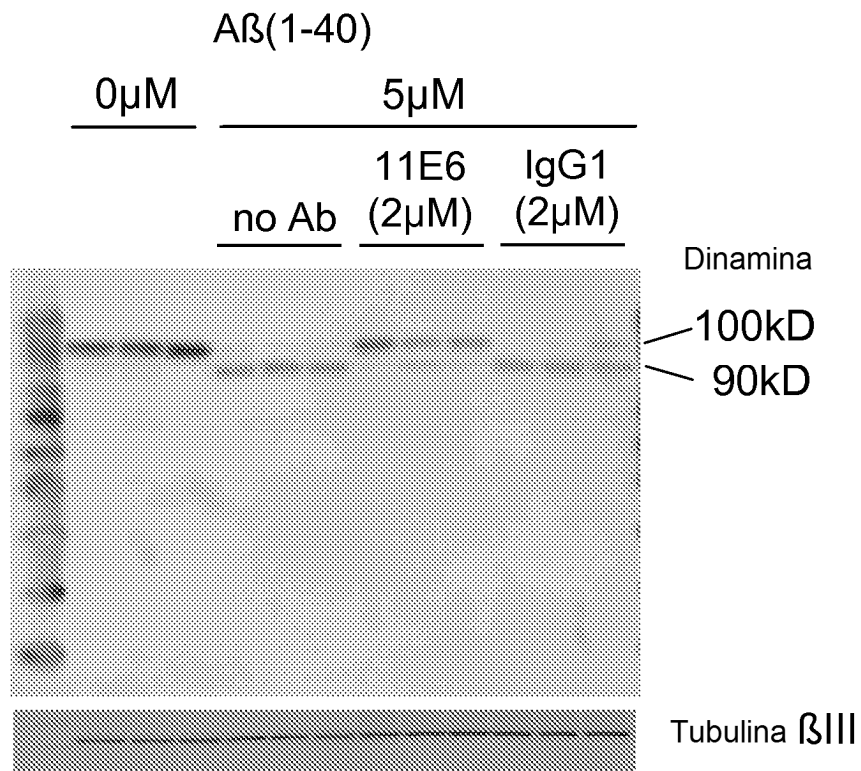


Fig. 10



Efecto del anticuerpo anti-RAGE 11E6

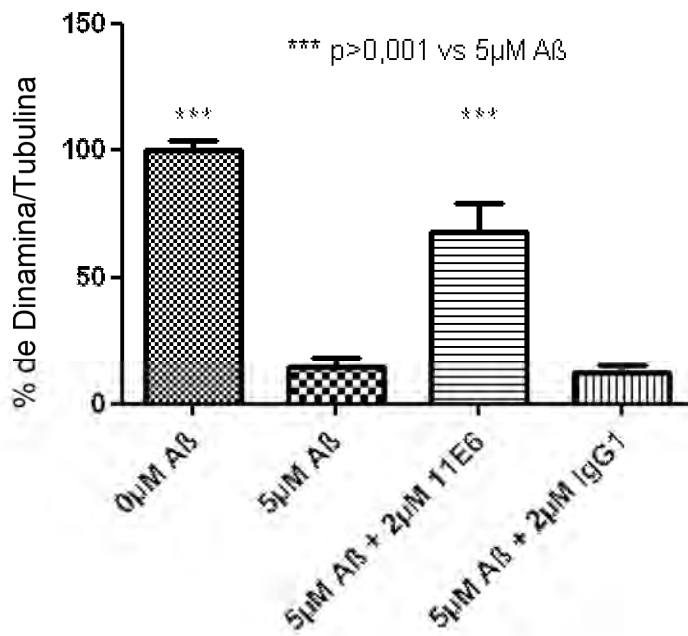


Fig. 11

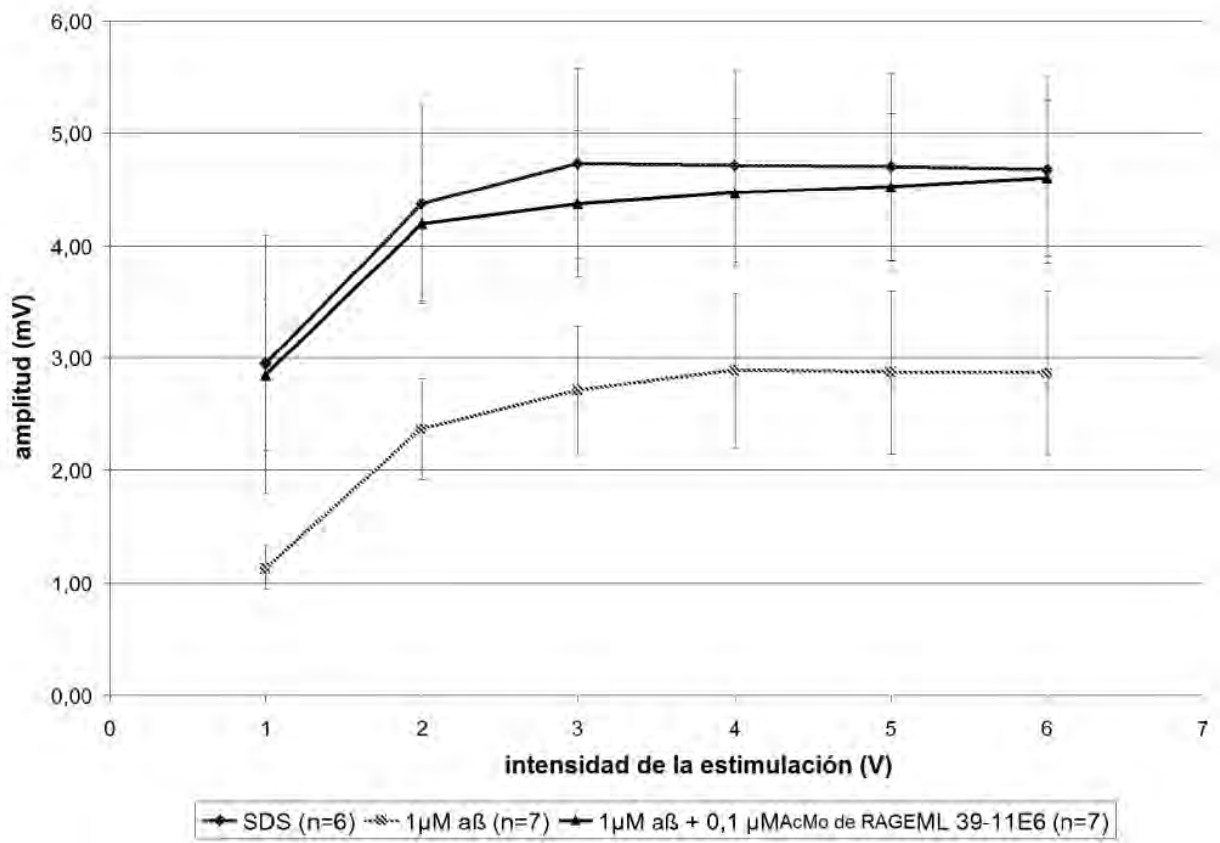


Fig. 12A

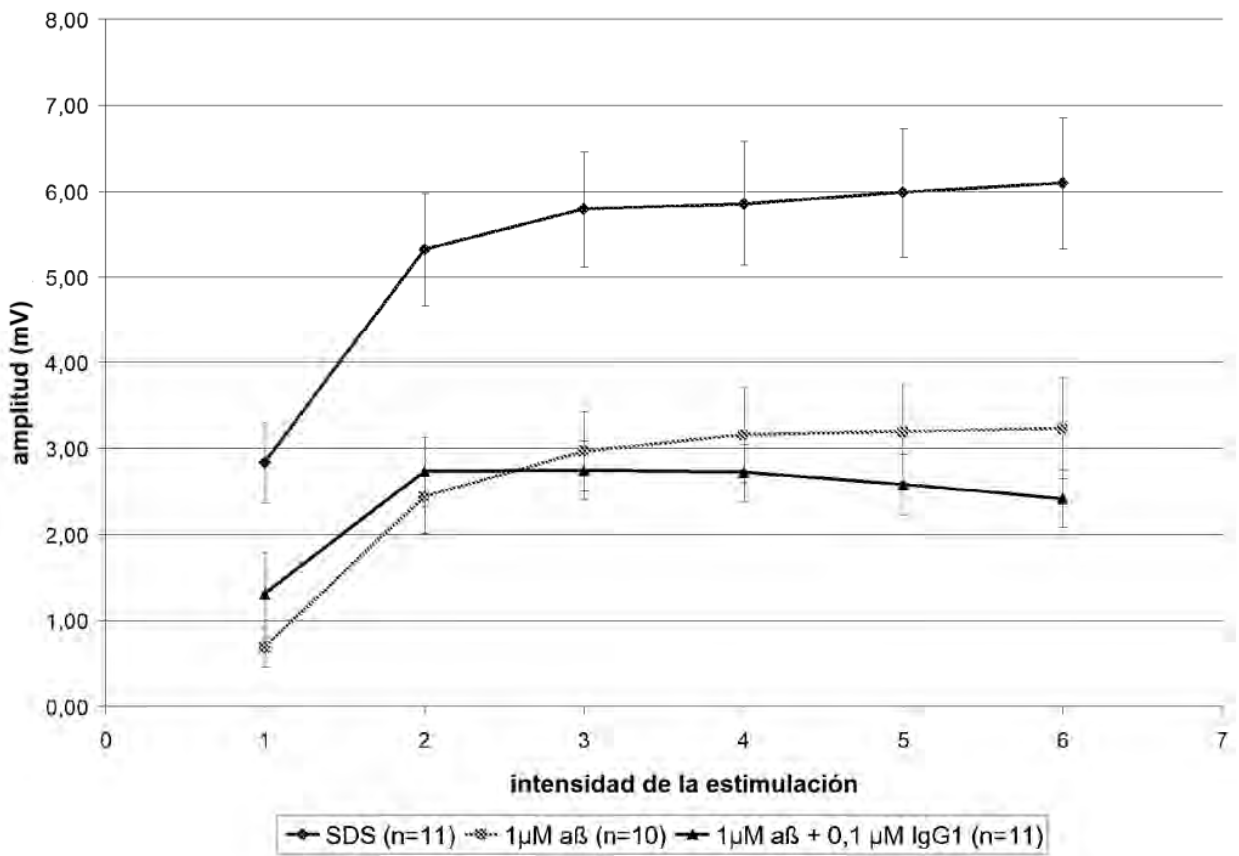


Fig. 12B

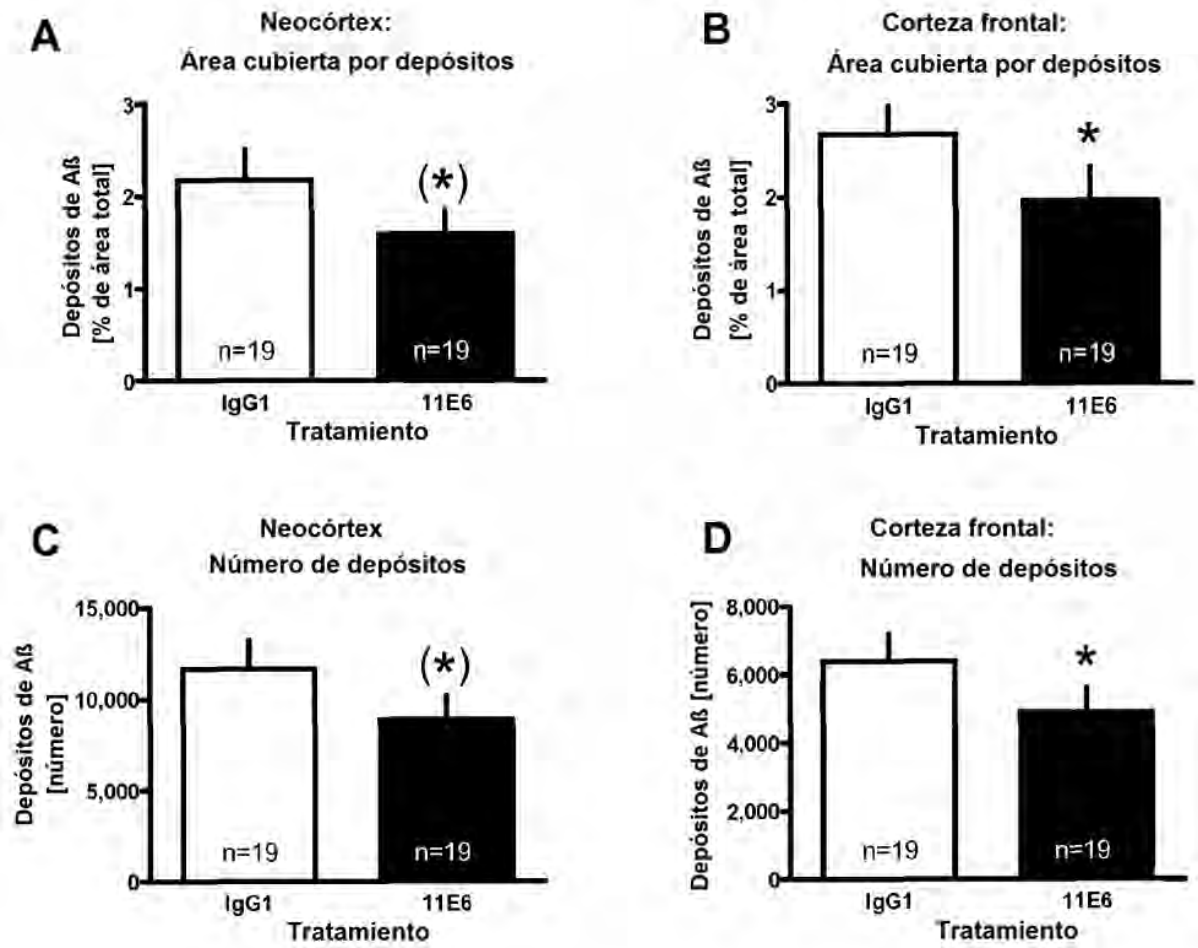


Fig. 13