

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 403**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2006 PCT/US2006/016071**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.11.2006 WO06118959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2006 E 06751677 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 1877442**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra el péptido beta-amiloide y procedimientos que usan los mismos**

30 Prioridad:

29.04.2005 US 676093 P
01.08.2005 US 704818 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.01.2017

73 Titular/es:

RINAT NEUROSCIENCE CORP. (100.0%)
230 E. GRAND AVE
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

ROSENTHAL, ARNON;
PONS, JAUME y
HO, WEI-HSIEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 597 403 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 dirigidos contra el péptido beta-amiloide y procedimientos que usan los mismos

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de las solicitudes provisionales de patente de EE.UU. con N.º de serie 60/676.093, presentada el 29 de abril de 2005 y de EE.UU. N.º de serie 60/704.818, presentada el 1 de agosto de 2005.

Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos contra el péptido beta-amiloide. La invención además se refiere al uso de estos anticuerpos en el tratamiento y/o prevención de enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer.

10 **Declaración con respecto a la investigación o desarrollo patrocinados por el gobierno federal**

No procede

Antecedentes de la invención

- 15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno cerebral degenerativo que clínicamente se caracteriza por déficit de memoria progresivo, confusión, deterioro físico gradual y finalmente, la muerte. Aproximadamente 15 millones de personas en todo el mundo padecen la enfermedad de Alzheimer y se espera que el número aumente drásticamente conforme aumentan las expectativas de vida. Histológicamente, la enfermedad se caracteriza por placas neuríticas, que se encuentran principalmente en la asociación de la corteza, el sistema límbico y los ganglios basales. El componente principal de estas placas es el péptido beta-amiloide (A β), que es el producto de escisión de la proteína precursora beta amiloide (β APP o APP). APP es una glucoproteína transmembrana de tipo I que contiene un dominio N-terminal ectópico grande, un dominio transmembrana y una cola C-terminal citoplásmica pequeña. El ajuste alternativo de la transcripción del único gen de la APP en el cromosoma 21 da lugar a varias isoformas que difieren en el número de aminoácidos.

- 25 Parece que A β tiene un papel principal en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. Las formas familiares de la enfermedad se han relacionado con mutaciones en los genes de APP y de la presenilina (Tanzi y col. 1996, Neurobiol. Dis. 3:159-168; Hardy, 1996, Ann. Med. 28:255-258). Las mutaciones ligadas a la enfermedad en estos genes dan lugar al aumento de la producción de la forma de 42 aminoácidos de A β , la forma predominante que se encuentra en las placas amiloides. Además, la inmunización de ratones transgénicos que sobreexpresan una forma mutante de APP ligada a enfermedades con A β humana reduce la cantidad de placa y las patologías asociadas (Schenk y col., 1999, Nature 400:173-177; documento WO 99/27944) y la administración periférica de anticuerpos dirigidos contra A β también reduce la cantidad de la placa en el cerebro (Bard y col. 2000. Nature Medicine 6(8):916-919; documentos WO 2004/032868 y WO 00/72880).

- 30 Se ha informado de que la fagocitosis mediada por Fc por las células microgliales y/o macrófagos es importante en el proceso de eliminación de la placa *in vivo*, Bard y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 2023-2028 (2003). Sin embargo, también se ha informado de que los mecanismos no mediados por Fc están implicados en la eliminación del péptido β -amiloide *in vivo* mediante inmunoterapia. Bacskai y col., J. Neurosci 22:7873-7878 (2002); Das y col., J Neurosci. 23:8532-8538 (2003).

- 35 Por tanto, la terapia con anticuerpos proporciona un enfoque prometedor al tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, los ensayos clínicos en seres humanos con una vacuna que incluía A β 1-42 se suspendieron debido a la meningoencefalitis en una subpoblación de pacientes. Orgogozo y col., Neurology 61:7-8 (2003); Ferrer y col., Brain Pathol. 14:11-20 (2004). Se ha informado de que la inmunización pasiva con un anticuerpo anti-A β N-terminal específico da lugar a una reducción significativa del amiloide principalmente difuso, pero induce un aumento de la frecuencia de microhemorragias encefálicas en ratones transgénicos que muestran el desarrollo relacionado con la edad de placas amiloides y de neurodegeneración así como de angiopatía amiloide cerebral (AAC) similar a la observada en el cerebro humano con ED (Pfeifer y col., Science 298:1379 (2002)). Se ha sugerido que la exacerbación de la microhemorragia asociada con angiopatía amiloide cerebral (AAC) en ratones transgénicos APP mediante la inmunización pasiva con un anticuerpo dirigido contra el péptido beta amiloide depende del reconocimiento por parte del anticuerpo de las formas depositadas del péptido beta amiloide. Racke y col., J. Neurosci 25:629-636 (2005). Se ha sugerido la inmunización pasiva con anticuerpos contra un componente peptídico de un depósito amiloide, cuyos anticuerpos están desprovistos de regiones Fc, para disminuir el riesgo de inflamación (documento WO 03/086310). Sigue existiendo una necesidad de anticuerpos y otros agentes inmunoterapéuticos dirigidos contra A β que tengan un perfil de eficacia y de seguridad mejorados y que sean adecuados para su uso en pacientes humanos.

A lo largo de la presente solicitud, se hará referencia a diversas publicaciones (incluyendo patentes y solicitudes de patentes).

55 **Breve resumen de la invención**

La invención divulgada en este documento se refiere a anticuerpos y polipéptidos que se unen al extremo C-terminal del péptido A β . En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un polipéptido que se une a A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃, en el que el anticuerpo o el polipéptido se unen al A β ₁₋₄₀ con una afinidad mayor que con la que se unen a A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃ y en el que el anticuerpo o el polipéptido se unen a un epítipo de A β ₁₋₄₀ que incluye los aminoácidos 25-34 y 40. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a A β ₁₋₄₀ con al menos aproximadamente una afinidad 40 veces superior que con la que se une a A β ₁₋₄₂ y/o A β ₁₋₄₃. En algunas realizaciones, el anticuerpo no es anticuerpo 2294.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo 6G (denominado de forma intercambiable "6G"). En la Figura 1 se muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de 6G. Las porciones de la región determinante de complementariedad (CDR) del anticuerpo 6G (incluyendo las CDR de Chothia y Kabat) también se muestran en la Figura 1.

La presente divulgación también proporciona variantes de anticuerpo 6G con las secuencias de aminoácidos mostradas en la Tabla 3.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un fragmento o una región del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3. En una realización de la invención, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo 6G. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo 6G. Aún en otra realización, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 6G. Aún en otra realización, el fragmento contiene una o más regiones variables procedentes de una cadena ligera y/o una cadena pesada mostrada en la Figura 1. Aún en otra realización, el fragmento contiene una o más CDR de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 6G.

La presente divulgación proporciona polipéptidos (que pueden o no ser un anticuerpo) que comprenden una cualquiera o más de las siguientes: a) una o más CDR del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; b) la CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; c) la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; d) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; e) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; f) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3. La divulgación proporciona polipéptidos (que pueden o no ser un anticuerpo) que comprenden una cualquiera o más de las siguientes: a) uno o más (uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR derivadas del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3, b) una CDR derivada de CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo 6G y/o c) una CDR derivada de CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo 6G. En algunas realizaciones, la CDR es una CDR mostrada en la Figura 1. En algunas realizaciones, la una o más CDR derivadas del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3 tienen al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad con al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis CDR de 6G o sus variantes.

En algunas realizaciones, la CDR es una CDR de Kabat. En otras realizaciones, la CDR es una CDR de Chothia. En otras realizaciones, la CDR es una combinación de una CDR de Kabat y una CDR de Chothia (también denominada "CDR combinada" o "CDR prolongada"). En otras palabras, para cualquier realización determinada que contiene más de una CDR, las CDR pueden ser de Kabat, de Chothia y/o combinadas.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. En otras realizaciones, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo (o polipéptido) está aislado. En algunas realizaciones, el anticuerpo (o polipéptido) está sustancialmente puro.

La región constante de la cadena pesada de los anticuerpos puede ser de cualquier tipo de región constante, tal como de IgG, IgM, IgD, IgA e IgE y de cualesquiera isotipos, tales como de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4

En algunas realizaciones, el anticuerpo o el polipéptido descritos en este documento tienen la función efectora alterada. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el polipéptido comprenden una región constante de la cadena pesada que tiene la función efectora alterada, en la que la región constante de la cadena pesada comprende una región Fc. En algunas realizaciones, se ha eliminado la N-glucosilación en la región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una mutación en la secuencia de reconocimiento de N-glucosilación, por lo que la región Fc del anticuerpo o polipéptido no está N-glucosilada. En algunas realizaciones, la región Fc está PEGilada. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo o del polipéptido es una región constante de la cadena pesada IgG2a humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (los aminoácidos se numeran en referencia a la secuencia de la IgG2a de tipo silvestre). En algunas realizaciones, el anticuerpo o el polipéptido comprenden una región constante de IgG4 que comprende las siguientes mutaciones: E233F234L235 a P233V234A235. Estas posiciones de aminoácidos se basan en la

numeración de Kabat.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido (que puede estar aislado) que comprende un polinucleótido que codifica un fragmento o una región del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3. En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo 6G. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo 6G. Aún en otra realización, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 6G. Aún en otra realización, el fragmento contiene una o más (es decir, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 6G.

10 En otro aspecto, la invención es un polinucleótido (que puede estar aislado) que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo 6G o de acuerdo con la divulgación sus variantes mostradas en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende uno o ambos polinucleótidos mostrados en la ID SEC N° 9 y en la ID SEC N° 10.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican cualesquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) o los polipéptidos descritos en el presente documento.

15 Otra divulgación proporciona vectores (incluyendo vectores de expresión y clonación) y células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en este documento.

Otra divulgación proporciona una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento.

20 Otra divulgación proporciona un complejo de $A\beta_{1-40}$, unido por el anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3.

Otra divulgación proporciona un complejo de $A\beta_{1-40}$ unido a cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en este documento.

25 En otro aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos, polipéptidos o de acuerdo con la divulgación polinucleótidos, descritos en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, los anticuerpos o los polipéptidos comprenden uno o más CDR del anticuerpo 6G.

30 En otro aspecto, la invención es un procedimiento de generación de un anticuerpo 6G que comprende cultivar una célula huésped o su progenie en condiciones que permitan la producción del anticuerpo 6G, en el que la célula huésped comprende un vector de expresión que codifica el anticuerpo 6G y en algunas realizaciones, purificar el anticuerpo 6G. En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende una o ambas secuencias de polinucleótidos mostradas en la ID SEC N° 9 y la ID SEC N° 10.

35 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de generación de cualesquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en este documento expresando uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo (que pueden expresarse por separado como una única cadena ligera o pesada, o ambas cadenas pesada y ligera se expresan a partir de un vector) o el polipéptido de una célula adecuada, generalmente seguido de la recuperación y/o aislamiento del anticuerpo o de los polipéptidos de interés.

40 La invención también proporciona un procedimiento para prevenir, tratar, inhibir o retrasar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades asociadas con la expresión alterada de $A\beta$ o β APP, o la acumulación del péptido $A\beta$, tales como el síndrome de Down, la enfermedad de Parkinson, la demencia multi-infarto, el deterioro cognitivo leve, la angiopatía amiloide cerebral, la depresión, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la demencia con cuerpos de Lewy y el SIDA. El procedimiento comprende administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido o un polinucleótido de la invención a un sujeto.

45 La invención también proporciona un procedimiento para retrasar el desarrollo de un síntoma asociado con la enfermedad de Alzheimer o con otras enfermedades relacionadas con la acumulación del péptido $A\beta$ en un sujeto que comprende administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido o un polinucleótido de la invención a un sujeto.

50 La invención también proporciona un procedimiento para suprimir la formación de placas amiloides y/o la acumulación amiloide en un sujeto que comprende administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido de la invención o de acuerdo con la divulgación un polinucleótido de la invención a un sujeto. En algunas realizaciones, las placas amiloides están en el encéfalo (tejido encefálico) del sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides están en la vasculatura encefálica. En otras realizaciones, la acumulación amiloide está en el sistema circulatorio.

55 La invención también proporciona un procedimiento para reducir las placas amiloides y/o la acumulación de amiloide en un sujeto que comprende administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que

comprende un anticuerpo, un polipéptido de la invención o de acuerdo con la divulgación un polinucleótido de la divulgación a un sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides se encuentran en el encéfalo (tejido encefálico) del sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides están en la vasculatura encefálica. En otras divulgaciones, la acumulación amiloide está en el sistema circulatorio.

5 La invención también proporciona un procedimiento para eliminar o retirar las placas amiloides y/o la acumulación amiloide en un sujeto que comprende administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido o de acuerdo con la divulgación un polinucleótido de la divulgación a un sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides están en el encéfalo (tejido encefálico) del sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides están en la vasculatura encefálica. En otras divulgaciones, la acumulación amiloide está en el sistema circulatorio.

Adicionalmente, la invención proporciona un procedimiento para inhibir la acumulación del péptido A β en un tejido que comprende poner en contacto el tejido con un anticuerpo o un polipéptido de la invención.

15 La invención también proporciona un procedimiento para reducir el péptido A β (tal como su forma soluble, oligomérica y de depósito) en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo, un polipéptido o un polinucleótido de la invención. En algunas realizaciones, se inhibe y/o reduce la acumulación del péptido A β en el encéfalo. En algunas realizaciones, se inhiben y/o reducen los efectos tóxicos del péptido A β . Por tanto, el procedimiento de la invención puede usarse para tratar cualquier enfermedad en la que se presenta o se sospecha de una acumulación del péptido A β , tal como la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la enfermedad de Parkinson, la demencia multi-infarto, el deterioro cognitivo leve, la angiopatía amiloide cerebral, la depresión, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o la demencia con cuerpos de Lewy.

20 La invención también proporciona procedimientos para mejorar la capacidad cognitiva o para invertir el deterioro cognitivo asociado a enfermedades con depósito amiloide de A β en un sujeto, tales como la enfermedad de Alzheimer, que comprende la administración de una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido de la invención o de acuerdo con la divulgación un polinucleótido de la divulgación a un sujeto.

25 Cualesquiera anticuerpos, polipéptidos o polinucleótidos descritos en el presente documento pueden utilizarse para los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo 6G.

30 Los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden utilizarse además para la detección, diagnóstico y control de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades asociadas con la expresión alterada de A β o de β APP, tal como el síndrome de Down y el SIDA. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra de un paciente del que se sospecha que presenta una expresión alterada de A β o β APP con un anticuerpo de la invención y determinar si el nivel de A β o β APP difiere del de una muestra control o de comparación. En algunas divulgaciones, el nivel sérico de A β se mide antes y después de la administración de un anticuerpo anti-A β ; y se evalúa cualquier aumento del nivel sérico de A β .

35 La administración de cualquier anticuerpo o polipéptido de la invención puede hacerse de cualquier manera conocida en la técnica, incluyendo: por vía intravenosa, subcutánea, mediante inhalación, intraarterial, intramuscular, intracardiaca, intraventricular, parenteral, intratecal e intraperitoneal. La administración puede ser sistémica, por ejemplo por vía intravenosa, o localizada. Generalmente, esto también se aplica a los polipéptidos y polinucleótidos de la invención.

40 La divulgación proporciona kits y composiciones que comprenden una o más de cualquiera de las composiciones descritas en este documento. Estos kits, generalmente adecuadamente empaquetados y provistos de las instrucciones apropiadas, son útiles para cualquiera de los procedimientos descritos en este documento.

Breve descripción de las distintas vistas del/de los dibujo(s)

45 La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (ID SEC N° 1) y la región variable de la cadena ligera (ID SEC N° 2) del anticuerpo 6G. Las CDR de Kabat se indican en negrita y las CDR de Chothia aparecen subrayadas. Los residuos de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada se numeran de forma secuencial.

50 La figura 2 muestra el mapeo de los epítomos del anticuerpo 6G mediante ELISA. Los péptidos A β (1-16, 1-28, 17-40, 17-42, 22-35, 28-40, 28-42, 1-38, 1-40, 1-42, 1-43 y 33-40) se inmovilizaron en placas de ELISA. El anticuerpo monoclonal 6G (20 nM) se incubó durante 1 h con los diversos péptidos inmovilizados. El anticuerpo 6G unido a los péptidos A β inmovilizados se midió usando un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti cadena kappa humana de cabra.

55 La figura 3 muestra el mapeo de los epítomos del anticuerpo 6G mediante ELISA. Diversos péptidos A β (ID SEC N° 18-29 asignadas a las secuencias de arriba a abajo) se inmovilizaron en placas de ELISA. El anticuerpo 6G se incubó durante 1 h con los diversos péptidos inmovilizados. El anticuerpo 6G unido a los péptidos A β

inmovilizados se midió usando un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti cadena kappa humana de cabra. "NB" se refiere a la falta de detección de unión.

La figura 4 es un gráfico esquemático que muestra el epítipo al que se une el anticuerpo 6G en A β . Se muestran las posiciones relativas de A β en la proteína precursora amiloide (APP) y la porción de APP en la membrana celular. "CT99" se refiere a los 99 aminoácidos del extremo C-terminal de APP. A la secuencia de aminoácidos mostrada se le asigna la ID SEC N° 30.

La figura 5 es una fotografía que muestra la inmunotinción de las células que expresan APP con un anticuerpo monoclonal dirigido contra A β ₁₋₁₆ (m2324) y anticuerpo 6G. Los paneles superiores muestran las células al microscopio de fluorescencia después de incubarse las células con m2324 o 6G (5 μ g/ml de cada uno) y la unión se detectó mediante un anticuerpo anti ratón o anti humano de cabra conjugado con Cy3 secundario. Los paneles inferiores muestran las células observadas al microscopio.

La figura 6 muestra el mapeo de los epítipos de los anticuerpos 2294 y 6G mediante ELISA. Diversos péptidos A β (asignados como ID SEC N° 18-26, 31 y 27-29 a las secuencias de arriba a abajo) se inmovilizaron en placas de ELISA. Los anticuerpos se incubaron durante 1 h con diversos péptidos inmovilizados. El anticuerpo 6G unido a los péptidos A β inmovilizados se midió usando un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti cadena kappa humana de cabra. El anticuerpo 2294 unido a los péptidos A β inmovilizados se midió usando un anticuerpo anti ratón de cabra que se une tanto a la cadena pesada como a la ligera y es un anticuerpo secundario conjugado con HRP. "NB" se refiere a la falta de detección de unión. Los números en las columnas denominadas "2294" y "6G" representan la absorbancia a 450 nm.

Descripción detallada de la invención

La invención divulgada en el presente documento proporciona anticuerpos y polipéptidos que se unen al extremo C-terminal de A β . La invención también proporciona polinucleótidos que codifican estos anticuerpos y/o polipéptidos. La invención también proporciona procedimientos para fabricar y utilizar estos anticuerpos y polipéptidos.

La invención también proporciona procedimientos para tratar o prevenir enfermedades asociadas con el depósito β -amiloide en un individuo, tales como la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la demencia multi-infarto, el deterioro cognitivo leve, la angiopatía amiloide cerebral, la depresión, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y la demencia con cuerpos de Lewy en un sujeto administrando al sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido de la invención, o de acuerdo con la presente divulgación un polinucleótido que codifica el anticuerpo o el polipéptido descrito en el presente documento.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican en detalle en la bibliografía, tal como en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction. (Mullis y col., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed , IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D., Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse de manera específica a una diana, tal como un carbohidrato, un polinucleótido, un lípido, un polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Según se usa en este documento, el término abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena única (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclases de los mismos) y no es necesario que el anticuerpo sea de

una clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases diferentes. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y algunas de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

Según se usa en este documento, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones aparecidas de forma natural que puedan presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante de un antígeno. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe considerarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que pueden utilizarse según la presente invención pueden obtenerse mediante el procedimiento de hibridomas descrito por primera vez por Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495 o pueden obtenerse mediante procedimientos de ADN recombinante tal como se describe en la patente de EE.UU. N.º 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1990, *Nature*, 348:552-554, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanizados" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo de receptor) en las que los residuos de una región de determinación de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo de donador), tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) del Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o estructurales importadas, pero se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno y típicamente dos, dominios variables completos, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. De forma óptima el anticuerpo humanizado comprenderá también al menos una porción de una región o dominio constante de la inmunoglobulina (Fc), que típicamente es el de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden tener regiones Fc modificadas, como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también pueden denominarse como una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

Según se usa en el presente documento, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para la producción de anticuerpos humanos conocidas en la técnica o divulgadas en el presente documento. Esta definición de anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humana o al menos un polipéptido de cadena ligera humana. Un ejemplo de esto es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y de cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando técnicas diversas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona a partir de una biblioteca de fagos, donde la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y col., 1998, *PNAS*, (EE.UU.) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Los anticuerpos humanos también pueden producirse introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, en ratones en los que los genes de la inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Este enfoque se describe en las patentes de EE.UU. N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016. Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse a partir de un individuo o pueden obtenerse por inmunización *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner y col., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; y la patente de EE.UU. N.º 5.750.373.

Según se usan en este documento, las expresiones "6G" y "anticuerpo 6G" se utilizan indistintamente para referirnos a un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada mostrada en la ID SEC N.º 11 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera mostrada en la ID SEC N.º 12. La secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera se muestran en la Figura 1. Las

porciones CDR del anticuerpo 6G (incluyendo las CDR de Chothia y Kabat) se muestran en forma de diagrama en la Figura 1. Los polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera se muestran en las ID SEC N° 13 e ID SEC N° 14. La caracterización de 6G se describe en los Ejemplos

Los términos “polipéptido”, “oligopéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por residuos no aminoacídicos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante una intervención; por ejemplo, la formación de un enlace disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de esta invención están basados en un anticuerpo, los polipéptidos pueden aparecer como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico” según se utilizan en este documento indistintamente, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si se presenta, la modificación de la estructura del nucleótido puede realizarse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede además modificarse tras la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “caperuzas”, sustitución de uno o más de los nucleótidos que aparecen de forma natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y aquellas con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen residuos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli L-lisina, etc.), aquellas con agentes intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen agentes alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del/de los polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes de forma habitual en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o puede conjugarse a soportes sólidos. Los grupos OH de los extremos 5' y 3' terminales puede estar fosforilados o sustituidos con aminas o residuos de grupos caperuza orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros grupos hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos de protección convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que generalmente, se conocen en la técnica, incluyendo por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos de azúcar, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas y lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitaciones, las realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O)NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ (“formacetal”), en los que cada R o R' es independientemente H o un alquilo (de 1 a 20 C) sustituido o no sustituido que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos referidos en este documento, incluyendo ARN y ADN.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, bien solas o bien en combinación. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones estructurales (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas entre sí en estrecha proximidad mediante las FR y con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Hay al menos dos técnicas para la determinación de las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia cruzada entre especies (es decir, Kabat y col. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª edición, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD) y (2) un enfoque basado en los estudios cristalográficos de los complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani y col. (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Según se usa en este documento, CRD puede hacer referencia a las CDR definidas mediante cualquier enfoque o mediante una combinación de ambos enfoques.

Una “región constante” de un anticuerpo hace referencia a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, bien solas o bien en combinación.

Un epítopo que “se une de manera preferencial” o “se une específicamente (utilizadas indistintamente en este documento) a un anticuerpo o un polipéptido es una expresión que se entiende bien en la técnica y también se

conocen bien en la técnica procedimientos para determinar tal unión específica o preferencial. Se dice que una molécula muestra una "unión específica" o una "unión preferencial" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con una duración mayor y/o con una afinidad mayor con una célula o sustancia en particular que con la que lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferencialmente" a una diana si se une con afinidad mayor, avidéz mayor, más fácilmente y/o con mayor duración que con la que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferencialmente a un epítipo de A β ₁₋₄₀ es un anticuerpo que se une a este epítipo con afinidad mayor, avidéz mayor, más fácilmente y/o con una mayor duración que con la que se une a otros epítipos de A β ₁₋₄₀ o a epítipos no A β ₁₋₄₀. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede o no unirse específica o preferentemente a una segunda diana. De este modo, "unión específica" o "unión preferencial" no necesariamente requiere (aunque puede incluirla) una unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión preferencial.

Según se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a un material que está al menos el 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), más preferiblemente al menos el 90 % puro, más preferiblemente al menos el 95 % puro, más preferiblemente al menos el 98 % puro, más preferiblemente al menos el 99 % puro.

Una "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de vector(es) para la incorporación de inserciones de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped y puede que la progenie no sea necesariamente idéntica por completo (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con un polinucleótido o con polinucleótidos de la presente invención.

La expresión "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de la cadena pesada de una inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana normalmente se define para que se extienda desde el residuo aminoacídico en la posición Cys226, o desde la Pro230, hasta el extremo carboxílico terminal de la misma. La numeración de los residuos de la región Fc es la del índice UE según Kabat. Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª Edición, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md, 1991. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3.

Según se usan en el presente documento, "receptor Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas de ajuste alternativo de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel y col., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34 y de Haas y col., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col., 1976, *J. Immunol.*, 117:587 y Kim y col., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

"Citotoxicidad dependiente de complemento" y "CDC" se refieren a la lisis de una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) formando complejo con un antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

Una "región Fc funcional" posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Los ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión de C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de la célula B; BCR), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo un dominio variable del anticuerpo) y pueden evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar estas funciones efectoras del anticuerpo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, pero que aún retiene al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de un aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y preferiblemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia

nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante de este documento preferiblemente poseerá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental y lo más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia con la presente, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia con la presente.

Según se usan en el presente documento, "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. La actividad ADCC de una molécula de interés puede evaluarse usando un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células NK. Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes y col., 1998 PNAS (USA), 95:652-656.

Según se usa el presente documento, una "dosis eficaz" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para obtener el efecto beneficioso o los resultados deseados. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como la eliminación o reducción del riesgo, la reducción de la gravedad, o el retraso de la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o del comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como inhibición, supresión o reducción de la formación de placas amiloides, reducción, eliminación, aclaramiento de las placas amiloides, mejora de la capacidad cognitiva, inversión o ralentización del deterioro cognitivo, secuestro o aumento del péptido A β soluble circulante en fluidos biológicos, disminución de uno o más síntomas que resultan de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la enfermedad, aumento de la calidad de vida de los que sufren la enfermedad, disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, potenciación del efecto de otra medicación, retraso de la progresión de la enfermedad y/o prolongación de la supervivencia de los pacientes. Puede administrarse una dosis eficaz en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir bien directa o bien indirectamente tratamiento profiláctico o terapéutico. Como se entiende en el ámbito clínico, una dosis eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no puede lograrse conjuntamente con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, una "dosis eficaz" puede considerarse en el ámbito de la administración de uno o más agentes terapéuticos y puede considerarse un único agente a administrarse en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes, puede darse o se logra un resultado deseable.

Según se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo resultados clínicos. Para los fines de la invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitaciones, uno o más de los siguientes: inhibir, suprimir o reducir la formación de placas amiloides, reducir, eliminar o aclarar las placas amiloides, mejorar la capacidad cognitiva, invertir o ralentizar el deterioro cognitivo, secuestrar el péptido A β soluble en circulación en los fluidos biológicos, reducir el péptido A β (incluyendo las formas soluble, oligomérica y depositada) en un tejido (tal como el encéfalo), inhibir, ralentizar y/o reducir la acumulación del péptido A β en el encéfalo, inhibir, ralentizar y/o reducir los efectos tóxicos del péptido A β en un tejido (tal como el encéfalo), disminuir los síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de los que sufren la enfermedad, disminuir la dosis de otras medicinas necesarias para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad y/o prolongar la supervivencia de los pacientes.

Según se usa en este documento, "retrasar" el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer significa aplazar, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad. Este retraso puede ser de longitudes de tiempo variables, dependiendo del historial de la enfermedad y/o del individuo que está siendo tratado. Como es evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, de hecho, abarcar la prevención, en la que el individuo no desarrolla la enfermedad. Un procedimiento para "retrasar" el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es un procedimiento que reduce la probabilidad del desarrollo de la enfermedad en un marco temporal determinado y/o reduce la extensión de la enfermedad en un marco temporal determinado, cuando se compara con la no utilización del procedimiento. Tales comparaciones típicamente se basan en estudios clínicos, usando un número estadísticamente significativo de sujetos.

El "desarrollo" de la enfermedad de Alzheimer significa el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un individuo. El desarrollo de la enfermedad de Alzheimer puede detectarse usando técnicas clínicas convencionales como se describen en el presente documento. Sin embargo, el desarrollo también se refiere a la progresión de la enfermedad que inicialmente puede ser indetectable. Para los fines de la

presente invención, la progresión se refiere al desarrollo biológico de la enfermedad, en este caso, según se determina mediante un examen neurológico convencional o con una entrevista con el paciente, o puede determinarse mediante pruebas más especializadas. Entre las diversas pruebas diagnósticas se incluyen, pero sin limitaciones, neuroimagen, detección de alteraciones en los niveles de proteínas específicas en el suero o en el líquido cefalorraquídeo (por ejemplo, péptidos amiloides y Tau), tomografía computerizada (TC) y formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). El “desarrollo” incluye aparición, recurrencia e inicio. Según se usa en este documento “inicio” o “aparición” de la enfermedad de Alzheimer incluye la aparición inicial y/o la recurrencia.

Según se usa en este documento, administración “conjunta” incluye la administración simultánea y/o la administración a tiempos diferentes. La administración conjunta también incluye la administración como una formulación conjunta o la administración como composiciones separadas. Según se usa en este documento, la administración conjunta pretende abarcar cualquier circunstancia en la que un anticuerpo anti-A β y otro agente se administran a un individuo, lo que puede tener lugar de forma simultánea y/o por separado. Según se discute adicionalmente en el presente documento, se entiende que un anticuerpo anti-A β y el otro agente pueden administrarse a frecuencias o intervalos de dosificación diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo anti-A β puede administrarse semanalmente, mientras que el otro agente puede administrarse con una frecuencia menor. Se entiende que el anticuerpo anti-A β y el otro agente pueden administrarse usando la misma vía de administración o por vías de administración diferentes.

Una “muestra biológica” abarca diversos tipos de muestras obtenidas a partir de un individuo y pueden usarse en un ensayo diagnóstico o de control. La definición abarca muestras de sangre y de otros líquidos de origen biológico, muestras sólidas de tejido tales como una muestra de una biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de estos y la progenie de las mismas. La definición también incluye muestras que se han manipulado de algún modo después de su obtención, tal como mediante el tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento en determinados componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o embebidas en una matriz semisólida o sólida con la finalidad de su seccionamiento. La expresión “muestra biológica” abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, líquido biológico y muestras de tejido.

Un “sujeto” (alternativamente denominado “individuo”) es un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Entre los mamíferos también se incluyen, pero sin limitaciones, animales de granja (tales como vacas), animales de competición, mascotas (tales como gatos, perros o caballos), primates, ratones y ratas.

Según se usa en este documento, “vector” significa una construcción, que es capaz de administrar y preferiblemente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitaciones, vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmidos o vectores de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Según se usa en el presente documento, “secuencia de control de la expresión” significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o puede ser un potenciador. La secuencia de control de la expresión está unida de forma operativa a la secuencia del ácido nucleico que se va a transcribir.

Según se usa en este documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite que el principio mantenga su actividad biológica y no es reactivo con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitaciones, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones como una emulsión de aceite en agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para la administración como aerosol o parenteral son una solución salina tamponada con fosfato o una solución salina normal (0,9 %). Las composiciones que comprenden estos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos (véanse, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co, Easton, PA, 1990 y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición, Mack Publishing, 2000):

El término “K_{on}”, según se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo a su antígeno.

El término “K_{off}”, según se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de un anticuerpo del complejo antígeno/anticuerpo.

El término “K_D”, según se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción del anticuerpo con el antígeno.

Composiciones y procedimientos para obtener las composiciones.

Anticuerpos y polipéptidos anti- β -amiloide.

La presente invención proporciona un anticuerpo que se unen al extremo C-terminal del péptido A β . La invención proporciona un anticuerpo o un polipéptido que se une a A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ y a A β ₁₋₄₃. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el polipéptido se unen a A β ₁₋₄₀ con afinidad mayor que con la que se unen a A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃. En algunas divulgaciones, el anticuerpo se une a A β ₁₋₃₆, A β ₁₋₃₇, A β ₁₋₃₈ y A β ₁₋₃₉. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a A β ₂₂₋₃₅. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a A β ₂₈₋₄₀. En algunas realizaciones el anticuerpo o el polipéptido se unen a un epítipo en A β ₁₋₄₀ que incluye los aminoácidos 25 a 34 y 40.

La presente invención también proporciona composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento (tales como el anticuerpo 6G y de acuerdo con la divulgación sus variantes mostradas en la Tabla 3 o de acuerdo con la invención polipéptido derivado del anticuerpo 6G y de acuerdo con la divulgación sus variantes mostradas en la Tabla 3) o los polinucleótidos descritos en el presente documento. Según se usa en este documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos o polipéptidos (de acuerdo con la divulgación que pueden o no ser un anticuerpo) que se unen al extremo C-terminal de A β ₁₋₄₀ y/o de acuerdo con la divulgación uno o más polinucleótidos que comprenden las secuencias que codifican uno o más anticuerpos o polipéptidos que se unen al extremo C-terminal de A β ₁₋₄₀. Estas composiciones pueden además comprender excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que se conocen bien en la técnica.

Los anticuerpos y polipéptidos de la divulgación se caracterizan por cualquiera (una o más) de las características siguientes: (a) se unen a A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃; (b) se unen a A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃ con una afinidad de unión mayor a A β ₁₋₄₀ que a A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃; (c) se unen a un epítipo de A β ₁₋₄₀ que incluye los aminoácidos 25 a 34 y 40; (d) se unen a A β ₁₋₃₆, A β ₁₋₃₇, A β ₁₋₃₈ y A β ₁₋₃₉, pero con afinidad menor en comparación con su unión a A β ₁₋₄₀; (e) se unen a A β ₂₂₋₃₇ con una K_D de menos de aproximadamente 1 μ M; (f) se unen a A β ₂₂₋₃₅; (g) se unen a A β ₂₈₋₄₀; (h) no se unen a la APP expresada en una célula; (i) suprimen la formación de las placas amiloides en un sujeto; (j) reducen las placas amiloides en un sujeto; (k) tratan, previenen o mejoran uno o más de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer o de otras enfermedades asociadas a la acumulación de péptido A β (por ejemplo, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, demencia multi-infarto, deterioro cognitivo leve, angiopatía amiloide cerebral, depresión, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia con cuerpos de Lewy); (l) mejoran la función cognitiva. Los anticuerpos y polipéptidos de la invención también pueden tener la función efectora alterada como se describe en el presente documento. Los anticuerpos y polipéptidos que tienen la función efectora alterada pueden mostrar un perfil de seguridad deseable en contraste con otros anticuerpos anti-A β publicados. Por ejemplo, las composiciones de la divulgación pueden no causar niveles significativos o inaceptables de uno cualquiera o más de los siguientes: sangrado de la vasculatura encefálica (hemorragia encefálica); meningoencefalitis (incluyendo cambios en la exploración por resonancia magnética); recuento de leucocitos elevado en el líquido cefalorraquídeo; inflamación del sistema nervioso central.

Por lo tanto, la divulgación proporciona cualquiera de los siguientes, o composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los siguientes: (a) anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (b) un fragmento o una región del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (c) una cadena ligera del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (d) una cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (e) una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la tabla 3; (f) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (g) la CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo 6G; (h) la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (i) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (j) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (k) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3 y (l) un anticuerpo que comprende uno cualquiera de (b) a (k). La divulgación también proporciona polipéptidos que comprenden uno o más de las anteriores.

Las porciones CDR del anticuerpo 6G (incluyendo las CDR de Chothia y de Kabat) se describen mediante un diagrama en la Figura 1. La determinación de las regiones CDR se incluye dentro de la experiencia de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y de Chothia (también denominadas "CDR combinadas" o "CDR prolongadas"). En algunas realizaciones, las CDR son CDR de Kabat. En otras realizaciones las CDR son las CDR de Chothia. En otras palabras, en realizaciones con más de un CDR, las CDR pueden ser de Kabat, de Chothia, CDR de combinación o combinaciones de las mismas.

En algunas divulgaciones, la invención proporciona un polipéptido (que puede ser o no un anticuerpo) que comprende al menos una CDR, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis CDR que son sustancialmente idénticas a al menos una CDR, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o todas las seis CDR de 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3. Otras

realizaciones incluyen anticuerpos que tienen al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que son sustancialmente idénticas a al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de 6G o derivados de 6G. En algunas realizaciones, las al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR son al menos aproximadamente el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3. Se entiende que, para los fines de la divulgación, la especificidad de unión y/o la actividad global generalmente se mantienen, aunque el grado de actividad puede variar en comparación con 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3 (puede ser mayor o menor).

La divulgación también proporciona un polipéptido (que puede ser o no un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos de 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3 que tiene cualquiera de los siguientes: al menos 5 aminoácidos contiguos, al menos 8 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de una secuencia de 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3, en la que al menos 3 de los aminoácidos son de una región variable de 6G (Figura 1) o sus variantes mostradas en la Tabla 3. En una realización, la región variable es de una cadena ligera de 6G. En otra realización, la región variable es de una cadena pesada de 6G. Un ejemplo de polipéptido tiene aminoácidos contiguos (de las longitudes descritas anteriormente) de las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la ligera de 6G. En otra realización, los 5 (o más) aminoácidos contiguos son de una región determinante de complementariedad (CDR) de 6G mostrada en la Figura 1. En algunas realizaciones, los aminoácidos contiguos son de una región variable de 6G.

Las afinidades de unión de los anticuerpos y polipéptidos de la divulgación pueden variar y no necesitan ser (aunque pueden serlo) un valor o intervalo en particular, como los ejemplos de realizaciones descritas a continuación. La afinidad de unión (K_D) de los anticuerpos y los polipéptidos de la invención a $A\beta_{1-40}$ puede ser de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,80 nM, de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 nM y de aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,72 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM o mayor que aproximadamente 40 pM. En una realización, la afinidad de unión está entre aproximadamente 2 pM y 22 pM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM. En algunas realizaciones de la invención, la afinidad de unión es de aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones de la invención, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 50 nM, menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 150 nM, menor de aproximadamente 200 nM, menor de aproximadamente 250 nM, menor de aproximadamente 500 nM o menor de aproximadamente 1.000 nM. En otras realizaciones de la invención, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 5 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 1 nM. En otras divulgaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente 0,1 nM o de aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 0,1 nM o menor de aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es de cualquiera de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM. Aún en otras realizaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, o mayor de aproximadamente 40 pM.

Los anticuerpos y polipéptidos de la invención también pueden unirse a uno o más de cualquiera de los siguientes: $A\beta_{1-36}$, $A\beta_{1-37}$, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-43}$ pero la afinidad de unión a uno o más de cualquiera de estos péptidos es menor que sus afinidades de unión a $A\beta_{1-40}$. En algunas realizaciones, la K_D de los anticuerpos o polipéptidos con respecto a uno o más de los siguientes $A\beta_{1-36}$, $A\beta_{1-37}$, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-42}$ y

$A\beta_{1-43}$ es al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces o al menos aproximadamente 250 veces la K_D de unión a $A\beta_{1-40}$.

La divulgación también proporciona procedimientos para producir cualquiera de estos anticuerpos o polipéptidos. Los anticuerpos de la presente invención se pueden obtener mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede generarse inmunizando a un mamífero con un péptido $A\beta$ (tal como utilizando $A\beta_{25-40}$ como el inmunógeno). Los polipéptidos pueden obtenerse mediante degradación proteolítica u otra degradación de los anticuerpos, mediante procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos de cadena sencilla o de fusión) según se describe con anterioridad o mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se producen convenientemente mediante síntesis química. Los procedimientos de síntesis química se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, podría producirse un anticuerpo mediante un sintetizador automático de polipéptidos empleando el procedimiento en fase sólida. Véanse también las patentes de EE.UU. N.º 5.807.715; 4.816.567 y 6.331.415

En otra realización alternativa de la invención, los anticuerpos se pueden producir de manera recombinante usando procedimientos que se conocen bien en la técnica. En una realización, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera del anticuerpo 6G mostradas en ID SEC N.º 9 e ID SEC N.º 10. En otra realización, los polinucleótidos que comprenden las secuencias de nucleótidos mostradas en la ID SEC N.º 9 y en la ID SEC N.º 10 se clonaron en uno o más vectores para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y a continuación, la célula huésped puede expandirse y congelarse para uso futuro. Los vectores (incluyendo los vectores de expresión) y las células huésped se describen con más detalle en este documento.

La invención también abarca fragmentos de la región variable de cadena única ("scFv") de los anticuerpos de la presente invención, tales como 6G. Los fragmentos de región variable de cadena única se producen uniendo las regiones variables de la cadena ligera y/o pesada utilizando un péptido enlazador corto. Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426. Un ejemplo de un péptido de enlace es $(GGGG)_3$, que introduce un puente de aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxilo terminal de una región variable y el extremo amino terminal de la otra región variable. Se han diseñado y usado enlazadores de otras secuencias. (Bird y col. (1988)). Los enlazadores pueden modificarse a su vez para conferirles funciones adicionales, tales como la unión a fármacos o la unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena única pueden producirse bien de forma recombinante o bien sintética. Para la producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automático. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contiene polinucleótido que codifica la scFv en una célula huésped adecuada, bien eucariota, tal como células de levaduras, de plantas, de insectos o de mamíferos, o procariota, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican la scFv de interés pueden producirse mediante manipulaciones rutinarias tales como ligamiento de polinucleótidos. La scFv resultante puede aislarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la técnica.

También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un engarce que es demasiado corto para permitir que pueda darse un apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando por lo tanto a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno (véase por ejemplo Hoiliger, P. y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J. y col. (1994) *Structure* 2:1112-1123).

Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes, usando los anticuerpos divulgados en este documento. Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh y col., 1986. *Methods in Enzymology* 121:210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basaba en la expresión conjunta de dos pares de cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas, teniendo las dos cadenas pesadas especificidades diferentes (Millstein y Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

Según un enfoque para producir anticuerpos biespecíficos, se fusionan los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. Preferiblemente la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3 . Se prefiere que la primera región constante de la cadena pesada (C_H1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en

vectores de expresión separados y se transfectan conjuntamente en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando proporciones distintas de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras de dos o de todas las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da lugar a rendimientos altos o cuando las proporciones no son de especial importancia.

En un enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y una pareja de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina solo en una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas. Este enfoque se describe en la Publicación PCT N.º WO 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994.

También están dentro del alcance de la invención los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han utilizado para dirigir a células del sistema inmune contra células no deseadas (Patente de EE.UU. N.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (publicaciones de las solicitudes PCT N.º WO 91/00360 y WO 92/200373; documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden obtenerse utilizando cualquier procedimiento de entrecruzamiento conveniente. Los agentes y técnicas de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en la técnica y se describen en la patente de EE.UU. N.º 4.676.980.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos de química de proteínas sintética, incluyendo aquellos que implican a agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de grupos disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

Puede producirse un anticuerpo humanizado que comprenda una o más CDR del anticuerpo 6G, o uno o más CDR derivados del anticuerpo 6G, utilizando cualesquiera procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, para humanizar un anticuerpo monoclonal pueden utilizarse cuatro etapas generales. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y la de aminoácidos prevista de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región estructural del anticuerpo se va a utilizar durante el proceso de humanización (3) las técnicas o metodologías de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; 6.180.370; 5.225.539 y 6.548.640.

En los anticuerpos humanizados recombinantes, la porción $Fc\gamma$ puede modificarse para prevenir la interacción con el receptor $Fc\gamma$ y con el sistema inmune del complemento. Este tipo de modificación fue diseñada por el Dr. Mike Clark del Departamento de Patología de la Universidad de Cambridge y las técnicas para la preparación de estos anticuerpos se describen en el documento WO 99/58572, publicado el 18 de noviembre de 1999.

Por ejemplo, la región constante puede modificarse genéticamente para que se parezca más a las regiones constantes humanas para prevenir la respuesta inmune si el anticuerpo se utiliza en ensayos clínicos y en tratamientos en seres humanos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.997.867 y 5.866.692.

La divulgación abarca modificaciones del anticuerpo 6G, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes, que no afectan significativamente sus propiedades y variantes que presentan una actividad y/o afinidad potenciada o reducida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 6G puede mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada al péptido $A\beta_{1-40}$. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no necesita ser descrita en detalle en el presente documento. La modificación de los polipéptidos se explica en los Ejemplos. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no producen cambios significativamente deletéreos en la actividad funcional o el uso de análogos químicos.

Las inserciones de una secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo terminal cuya longitud oscila de un residuo a polipéptidos que contienen un centenar de residuos o más, así como inserciones intrasecuencia de un único residuo de aminoácido o de múltiples residuos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un epítipo etiqueta. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en los extremos N o C terminales del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

5 Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido eliminado en la molécula del anticuerpo y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, aunque también se contemplan las alteraciones en la zona FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de “sustituciones conservadoras”. Si estas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados “ejemplos de sustituciones” en la Tabla 1 o según se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos y los productos se analizan.

Tabla 1: sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones conservadoras	Ejemplos de sustituciones
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp; Lys, Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser, Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val, Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

10

15 Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, con una conformación en lámina o en hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que aparecen de forma natural se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) No polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polares sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Ácidos (cargado negativamente): Asp, Gln;
- (4) Básicos (cargado positivamente): Lys, Arg;

(5) Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro y

(6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservadoras se realizan mediante el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro de otra clase.

5 También puede sustituirse cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir los entrecruzamientos aberrantes. Por el contrario, pueden añadirse enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, especialmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv.

10 Las modificaciones de aminoácidos pueden oscilar de cambiar o modificar uno o más aminoácidos a rediseñar completamente una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad y/o especificidad de unión. En algunas divulgaciones, no se hacen más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro de un dominio CDR. En otras divulgaciones, no se hacen más de una a tres sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de un dominio CDR. Aún en otras realizaciones, el dominio CDR es CDRH3 y/o CDRL3.

15 Las modificaciones también incluyen polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos, con otras modificaciones postraduccionales, tales como, por ejemplo, glucosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos se glucosilan en posiciones conservadas de sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright y Morrison, 1997; TibTECH 15:26-32).
 20 Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd y col., 1996, Mol. Immunol 32:1311-1318; Wittwe y Howard. 1990. Biochem. 29:4175-4180) y a la interacción intramolecular entre porciones de la glucoproteína, lo que puede afectar a la conformación y a la superficie tridimensional presentada de la glucoproteína (Hefferis y Lund, *supra*; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech 7:409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir a una glucoproteína determinada
 25 hacia determinadas moléculas en base a estructuras de reconocimiento específicas. También se ha informado de que la glucosilación de los anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En particular, se ha informado de que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminotransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc biseccionante, tienen una actividad ADCC mejorada (Umana y col., 1999, Mature
 30 Biotech. 17:176-180).

Típicamente la glucosilación de anticuerpos es bien enlazada a N o bien enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión del residuo de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias tripeptídicas asparragina-X-serina, asparragina-X-treonina y asparragina-X-cisteína, donde X es
 35 cualquier aminoácido salvo prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del residuo del hidrato de carbono a la cadena lateral de la asparragina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más normalmente a serina o treonina, aunque también puede utilizarse 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

40 La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos para que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación enlazada a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución de, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glucosilación enlazada a O).

45 El patrón de glucosilación de anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glucosilación depende en gran medida de la célula huésped utilizada para expresar el anticuerpo. Puesto que el tipo de célula utilizada para la expresión de glucoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como posible agente terapéutico raramente es la célula nativa, se puede esperar que aparezcan variaciones en el patrón de glucosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse y col., 1997,
 50 J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan a la glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación de los medios, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuestos diversos procedimientos para alterar el patrón de glucosilación que se consigue en un organismo huésped en
 55 particular incluyendo la introducción o sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patentes de EE.UU. N.º 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glucosilación, o ciertos tipos de glucosilación, pueden eliminarse enzimáticamente de la glucoproteína, por ejemplo, usando endoglucosidasa H (Endo H), N-glucosidasa F como se describe en el Ejemplo 1, endoglucosidasa F1, endoglucosidasa F2 o endoglucosidasa F3. Además, la célula huésped recombinante puede manipularse

genéticamente para que sea defectiva en el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Estas y otras técnicas similares son bien conocidas en la técnica.

5 Otros procedimientos de modificación incluyen usar técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, medios enzimáticos, sustituciones oxidativas y quelación. Pueden utilizarse modificaciones, por ejemplo, para la unión de marcadores para inmunoensayo. Los polipéptidos de 6G modificados se obtienen usando procedimientos establecidos en la técnica y pueden analizarse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los Ejemplos.

10 Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados según se describe en la Publicación PCT N.º WO 99/58572, publicada el 18 de noviembre de 1999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a todo o parte de un dominio constante de una cadena pesada de una inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente de complemento significativa, o la destrucción mediada por células de la diana. En algunas realizaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIIb. Típicamente estos se basan en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios C_H2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de este modo son especialmente adecuados para usar en la terapia crónica con anticuerpos, para prevenir las reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia convencional con anticuerpos.

20 La divulgación incluye realizaciones maduras de afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos de afinidad madurada pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica (Marks y col., 1992, Bio/Technology, 10:779-783; Barbas y col., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3809-3813; Schier y col., 1995, Gene, 169:147-155; Yelton y col., 1995, J. Immunol., 155:1994-2004; Jackson y col., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins y col., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896 y el documento WO2004/058184).

25 Pueden usarse los procedimientos siguientes para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una manera de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorando) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo, se denomina "mutagénesis por exploración de bibliotecas". Generalmente, la mutagénesis por exploración de bibliotecas funciona de la siguiente manera. Se sustituyen una o más posiciones de aminoácidos en la CDR por dos o más (tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 30 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) aminoácidos usando procedimientos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, una para cada posición de aminoácido que se analiza), cada una de ellas con una complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). Generalmente, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (sin sustituir). Se analiza la afinidad de unión al polipéptido diana (o a otra diana de unión) de un pequeño número de clones de cada biblioteca, por ejemplo, aproximadamente de 20 a 80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca) y se identifican los candidatos que presentan una unión aumentada, la misma unión, una unión reducida o ninguna unión. Los procedimientos para determinar la afinidad de unión son bien conocidos en la técnica. La afinidad de unión puede determinarse usando análisis de resonancia del plasmón superficial BIAcore, que detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente 2 veces o más. BIAcore es especialmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente elevada, por ejemplo con una K_D de aproximadamente 10 nM o menor. El análisis usando resonancia del plasmón superficial BIAcore se describe en los ejemplos, en el presente documento.

45 La afinidad de unión puede determinarse usando Kinexa Biocensor, ensayos de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORI GEN (IGEN), amortiguación de la fluorescencia, transferencia de fluorescencia y/o presentación de levaduras. La afinidad de unión también puede analizarse usando bioensayos adecuados.

50 En algunas divulgaciones, cada posición de los aminoácidos en una CDR se sustituye (en algunas realizaciones, uno cada vez) por los 20 aminoácidos naturales usando procedimientos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en el presente documento). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, una para cada posición de aminoácido que se analiza), cada una de ellas con una complejidad de 20 miembros (si se sustituyen los 20 aminoácidos en cada posición).

55 En algunas divulgaciones, la biblioteca que se va a analizar comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden estar en la misma CDR o en dos o más CDR. Por tanto, la biblioteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones de una CDR. La biblioteca puede comprender una sustitución en dos o más posiciones de dos o más CDR. La biblioteca puede comprender sustituciones en 3, 4, 5 o más posiciones, dichas posiciones pueden encontrarse en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. La sustitución puede prepararse usando codones de baja redundancia. Véase, por ejemplo, la Tabla 2 de Balint y col., (1993) Gene 137(1):109-18.

60 La CDR puede ser CDRH3 y/o CDRL3. La CDR puede ser uno o más de entre CDRL1, CDRL2, CDRL3,

CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3 La CDR puede ser una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o una CDR prolongada.

5 Los candidatos con la capacidad de unión mejorada pueden secuenciarse, identificando de este modo un mutante de sustitución en CDR que da lugar a una mejora de la afinidad (también denominada sustitución "mejorada). Los candidatos que se unen también pueden secuenciarse, identificando de este modo una sustitución en CDR que retiene la capacidad de unión.

10 Pueden realizarse múltiples rondas de análisis. Por ejemplo, los candidatos (comprendiendo cada uno una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de una o más CDR) con capacidad de unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contiene al menos el aminoácido original y el sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, la posición de los aminoácidos en la CDR en la que un mutante de sustitución muestra una capacidad de unión mejorada). La preparación y análisis o selección de esta biblioteca se describe en más detalle a continuación.

15 La mutagénesis por exploración de bibliotecas también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en la medida en que la frecuencia de clones con unión mejorada, unión igual, unión disminuida o falta de unión también proporciona información relativa a la importancia de cada posición de aminoácidos para la estabilidad del complejo entre el anticuerpo y el antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR mantiene la unión cuando se cambia a todos los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición que es improbable que se requiera para la unión al antígeno. Por el contrario, si una posición de la CDR mantiene la unión solo en un pequeño porcentaje de las sustituciones, esa posición se identifica como una posición que es importante para la función de la CDR. Por tanto, los procedimientos de mutagénesis por exploración de bibliotecas generan información con respecto a las posiciones en las CDR que pueden cambiarse por muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos) y las posiciones en las CDR que no pueden cambiarse o que solo pueden cambiarse por unos pocos aminoácidos.

25 Los candidatos que presentan una afinidad mejorada pueden combinarse en una segunda biblioteca, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición y además puede incluir sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo de la complejidad de la biblioteca que se desee, o permitir usar el procedimiento de análisis o de selección deseado. Además, si se desea, puede cambiarse de forma aleatoria una posición de un aminoácido adyacente por al menos uno o más aminoácidos. El cambio aleatorio de aminoácidos adyacentes puede permitir una flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, que puede a su vez permitir o facilitar la introducción de un número mayor de mutaciones de mejora. La biblioteca también puede comprender sustituciones en las posiciones que no mostraron una mejora de la afinidad en la primera ronda de selección.

30 La biblioteca secundaria se analiza o selecciona con el fin de obtener miembros de la biblioteca con una afinidad de unión mejorada y/o alterada usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo la selección usando el análisis de resonancia del plasmón superficial BIAcore y la selección usando cualquier procedimiento conocido en la técnica para la selección, incluyendo la presentación en fagos, la presentación en levaduras y la presentación en ribosomas.

35 La divulgación también abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos (tales como 6G) o polipéptidos de esta invención. En una divulgación, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena ligera mostrada en la ID SEC N° 2 (Figura 1) y/o al menos 10 aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la ID SEC N° 1 (Figura 1). En otras divulgaciones, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena ligera mostrada en la ID SEC N° 2 (Figura 1) y/o al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la ID SEC N° 1 (Figura 1). En otra divulgación; el polipéptido de fusión comprende una región variable de la cadena ligera y/ una región variable de la cadena pesada de 6G, como se muestra en ID SEC N° 2 e ID SEC N° 1 de la Figura 1. En otra divulgación de realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR de 6G. Aún en otras divulgaciones, el polipéptido de fusión comprende la CDR H3 y/o la CDR L3 del anticuerpo 6G. Para los fines de esta divulgación, una proteína de fusión de 6G contiene uno o más anticuerpos 6G y otra secuencia de aminoácidos a la que no está unida en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Los ejemplos de secuencias heterólogas incluyen, pero sin limitaciones, una "etiqueta" tal como una etiqueta FLAG o una etiqueta 6His. Las etiquetas son bien conocidas en la técnica.

60 Un polipéptido de fusión de 6G puede crearse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, de forma sintética o recombinante. Típicamente, las proteínas de fusión de 6G de esta invención se obtienen preparando y expresando un polinucleótido que las codifica usando procedimientos recombinantes descritos en el presente documento, aunque pueden prepararse también mediante otros procedimientos conocidos en

la técnica, incluyendo, por ejemplo, la síntesis química.

Esta divulgación también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos o polipéptidos 6G conjugados (por ejemplo, unidos) a un agente que facilitan el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Para simplificar, generalmente se hará referencia a 6G o a anticuerpos con el entendimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a $A\beta_{1-40}$ descritas en el presente documento. Generalmente la conjugación se refiere a la unión de estos componentes como se describe en el presente documento. La unión (en la que generalmente estos componentes se fijan en asociación próxima al menos para su administración) puede lograrse de numerosas formas. Por ejemplo, es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contenga un carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contenga un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Un anticuerpo o polipéptido de esta invención puede estar unido a un agente de marcaje (denominado alternativamente "marcador") tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualesquiera otros marcadores conocidos en la técnica. Los marcadores son conocidos en la técnica porque generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal.

La divulgación también proporciona composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) y kits que comprenden el anticuerpo 6G y como aclara esta divulgación, cualquiera o todos los anticuerpos y/o los polipéptidos descritos en este documento.

Anticuerpos anti- β y polipéptidos que tienen la función efectora alterada

Los anticuerpos o polipéptidos (incluyendo composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento pueden tener la función efectora alterada. Según se usa en el presente documento, un anticuerpo o un polipéptido que tiene una "función efectora alterada" (utilizado indistintamente con "inmunológicamente inerte" o "parcialmente inerte "inmunológicamente") se refiere a anticuerpos o polipéptidos que no tienen ninguna función efectora o tienen la actividad o actividades de función efectora reducidas (en comparación con el anticuerpo o polipéptido que tiene una región constante que aparece de forma natural o no modificada), por ejemplo, que no tiene actividad o presenta actividad reducida en uno o más de los siguientes aspectos: a) desencadenamiento de la lisis mediada por complemento; b) estimulación de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y c) activación de la microglía. La actividad de función efectora puede reducirse en aproximadamente cualquiera del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % y 100 %. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un péptido beta-amiloide sin desencadenar una lisis dependiente de complemento significativa o la destrucción mediada por células de la diana. Por ejemplo, el sitio de unión al receptor de Fc en la región constante puede haber sido modificado o mutado para eliminar o reducir la afinidad de unión a ciertos receptores de Fc, tales como $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ y/o $Fc\gamma RIII$. Para simplificar, se hará referencia a los anticuerpos con el entendimiento de que las realizaciones también se aplican a polipéptidos. El sistema de numeración del UE (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest; 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) se usa para indicar qué residuos de aminoácidos de la región constante (por ejemplo, de un anticuerpo IgG) están alterados o mutados. La numeración puede usarse para un tipo específico de anticuerpo (por ejemplo, IgG1) o una especie (por ejemplo, humano) con el entendimiento de que pueden realizarse cambios similares en diferentes tipos de anticuerpos y especies.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a un péptido $A\beta$ comprende una región constante de la cadena pesada que tiene la función efectora alterada. La región constante de la cadena pesada puede tener secuencia que aparece de forma natural o es una variante. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada que aparece de manera natural esta mutada, por ejemplo, mediante sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos, por tanto la función efectora de la región constante está alterada. En algunas realizaciones, la N-glucosilación de la región Fc de una región constante de la cadena pesada también puede cambiarse, por ejemplo, puede eliminarse por completo o parcialmente, de modo que la función efectora de la región constante está alterada.

En algunas realizaciones, la función efectora se altera eliminando la N-glucosilación de la región Fc (por ejemplo, en el dominio C_{H2} de IgG) del anticuerpo anti-péptido $A\beta$. En algunas realizaciones, se elimina la N-glucosilación de la región Fc mediante la mutación del residuo de aminoácido glucosilado o de los residuos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de la glucosilación en la región constante. Las secuencias tripeptídicas asparragina-X-serina (N-X-S), asparragina-X-treonina (N-X-T) y asparragina-X-cisteína (N-X-C), donde X es cualquier aminoácido salvo prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del residuo de hidrato de carbono en la cadena lateral de la asparragina para la N-glucosilación. La mutación de cualquiera de los aminoácidos en las secuencias tripeptídicas en la región constante da lugar a una IgG sin glucosilar. Por ejemplo, el sitio N297 de N-glucosilación de las IgG1 e IgG3

humanas puede mutarse a A, D, Q, K o H. Véase, Tao y col., *J. Immunol.* 143: 2595-2601 (1989) y Jefferis y col., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). Se ha informado de que la IgG1 y la IgG3 humanas con la sustitución de Asn-297 por Gln, His o Lys no se unen al Fc γ RI humano y no activan el complemento perdiéndose por completo la capacidad de unión a C1q de la IgG1 y disminuyendo drásticamente para la IgG3. En algunas realizaciones, el aminoácido N en las secuencias tripeptídicas se ha mutado por uno cualquiera de los aminoácidos: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y. En algunas realizaciones, el aminoácido N de las secuencias tripeptídicas se muta por una sustitución conservadora. En algunas realizaciones, el aminoácido X en las secuencias tripeptídicas se muta por una prolina. En algunas realizaciones, el aminoácido S en las secuencias tripeptídicas se muta a A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y. En algunas realizaciones, el aminoácido T en las secuencias tripeptídicas se muta a A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y. En algunas realizaciones, el aminoácido C en las secuencias tripeptídicas se muta a A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y. En algunas realizaciones, el aminoácido que sigue al tripeptido se muta a P. En algunas realizaciones, la N-glucosilación en la región constante se elimina enzimáticamente (tal como mediante N-glucosilasa F como se describe en el Ejemplo 1, endoglucosidasa F1, endoglucosidasa F2, endoglucosidasa F3 y endoglucosidasa H). La eliminación de la N-glucosilación también puede lograrse mediante la producción del anticuerpo en una línea celular que presenta una deficiencia en la N-glucosilación, Wright y col., *J. Immunol.* 160(7):3393-402 (1998).

En algunas realizaciones, el residuo aminoacídico que interacciona con el oligosacárido unido al sitio de N-glucosilación de la región constante se muta para reducir la afinidad de unión a Fc γ RI. Por ejemplo, los residuos F241, V264, D265 de la IgG3 humana pueden estar mutados. Véase, Lund y col., *J. Immunology* 157:4963-4969 (1996).

En algunas realizaciones, la función efectora se altera modificando regiones tales como de 233 a 236, 297 y/o de 327 a 331 de la IgG humana como se describe en el documento PCT WO 99/58572 y en Armour y col., *Molecular Immunology* 40. Los anticuerpos descritos en el documento PCT WO 99/58572 y en Armour y col. comprenden, además de un dominio de unión que se dirige a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homólogos a toda o a parte de una región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente de complemento significativa o destrucción mediada por la célula de la diana. En algunas realizaciones, el dominio efector tiene una afinidad reducida por Fc γ RI, Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb. En algunas realizaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o Fc γ RIIIb. Típicamente estos se basan en dominios químicos derivados de dos o más dominios C $_H$ 2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son especialmente adecuados para su uso en terapia crónica con anticuerpos, para eliminar reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a una terapia con anticuerpos convencional. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es una cadena pesada humana de la IgG1 con cualquiera de las siguientes mutaciones: 1) A327A330P331 a G327S330S331; 2) E233L234L235G236 a P233V234A235 con delección de G236; 3) E233L234L235 a P233V234A235; 4) E233L234L235G236A327A330P331 a P233V234A235G327S330S331 con delección de G236; 5) E233L234L235A327A330P331 a P233V234A235G327S330S331 y 6) N297 a A297 o cualquier otro aminoácido salvo N. Estas mutaciones pueden combinarse, por ejemplo, cualquiera de 1) a 5) puede combinarse con 6). En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es una cadena pesada humana de la IgG2 con las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331; N297 a Q297 y N297G327A330P331 a Q297G327S330S331. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es una cadena pesada humana de IgG4 con cualquiera de las siguientes mutaciones: E233F234L235G236 a P233V234A235 con delección de G236; E233F234L235 a P233V234A235; P228L235 a S228E235; N297 a Q297 y E233F234L235G236N297 a P233V234A235G236Q297.

La región constante de los anticuerpos también puede modificarse para alterar activación del complemento. Por ejemplo, la activación del complemento de los anticuerpos IgG tras la unión del componente C1 del complemento puede reducirse mediante la mutación de residuos de aminoácidos en la región constante en un resto de unión C1 (por ejemplo, resto de unión C1q). Se ha informado de que la mutación de Ala de cada uno de los aminoácidos D270, K322, P329, P331 de la IgG1 humana reduce significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a C1q y activar complemento. Para la IgG2b murina, el resto de unión a C1q está compuesto por los residuos E318, K320 y K322. Idusogie y col., *J. Immunology* 164:4178-4184 (2000); Duncan y col., *Nature* 322: 738-740 (1988).

Se cree que el resto E318, K320 y K322 de unión a C1q identificado para la IgG2b murina es común a otros isotipos del anticuerpo. Duncan y col. *Nature* 322: 738-740 (1988). La actividad de unión a C1q de IgG2b puede eliminarse sustituyendo cualquiera de los tres residuos especificados por un residuo que tiene una funcionalidad no adecuada en su cadena lateral. No es necesario sustituir los residuos iónicos solo por Ala para eliminar la unión a C1q. También es posible utilizar otros residuos no iónicos sustituidos con alquilo, tal como Gly, Ile, Leu o Val, o residuos no polares aromáticos tales como Phe, Tyr, Trp y Pro en lugar de cualquiera de los tres residuos para prevenir la unión a C1q. Además, también es posible utilizar estos residuos no iónicos polares como Ser, Thr, Cys y Met en lugar de los residuos 320 y 322, pero no el 318 para prevenir la actividad de unión a C1q.

La divulgación también proporciona anticuerpos que tienen función efectora alterada en la que el anticuerpo tiene una región bisagra modificada. La afinidad de unión de la IgG humana a sus receptores Fc puede modularse mediante la modificación de la región bisagra. Canfield y col., J. Exp. Med. 173:1483-1491 (1991); Hezareh y col. J. Virol. 75:12161-12168 (2001); Redpath y col., Human Immunology 59:720-727 (1998).
 5 Pueden mutarse o suprimirse residuos de aminoácidos específicos. La región bisagra modificada puede comprender una región bisagra completa derivada de un anticuerpo de clase o subclase diferente a la del dominio C_H1. Por ejemplo, el dominio constante (C_H1) de un anticuerpo de clase IgG puede unirse a una región bisagra de un anticuerpo de clase IgG4. Alternativamente la nueva región bisagra puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad repetitiva en la que cada unidad de la repetición deriva de una
 10 región bisagra natural. En algunas realizaciones, la región bisagra natural se altera convirtiendo uno o más residuos de cisteína en un residuo neutro, tal como alanina, o convirtiendo residuos colocados adecuadamente en residuos cisteína. Patente de EE.UU. N.º 5.677.425. Tales alteraciones se realizan usando química de proteínas reconocida en la técnica y preferiblemente, técnicas de ingeniería genérica y como se describe en el presente documento.

15 También pueden usarse para los procedimientos descritos en el presente documento polipéptidos que se unen específicamente a un péptido Aβ y se fusionan con una región constante de la cadena pesada que tiene alterada la función efectora. En algunas realizaciones, los polipéptidos comprenden una secuencia derivada de un anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3. En algunas realizaciones, el polipéptido deriva de un anticuerpo de dominio único que se une a un péptido Aβ. El anticuerpo de dominio único puede generarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Omidfar y col., Tumour Biol. 25:296-305 (2004);
 20 Herring y col., Trends in Biotechnology 21:484-489 (2003).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o polipéptido es un fragmento F(ab')₂. En algunas realizaciones, el anticuerpo o polipéptido de un fragmento Fab. En algunas realizaciones, el anticuerpo o polipéptido es un anticuerpo de cadena única scFv. En algunas realizaciones, el anticuerpo o polipéptido de un F(ab')₂
 25 PEGilado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o polipéptido es un fragmento Fab PEGilado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o polipéptido es un anticuerpo de cadena única scFv PEGilado.

También pueden usarse otros procedimientos para producir anticuerpos que tienen una función efectora alterada conocidos en la técnica.

30 Los anticuerpos y polipéptidos con la región constante modificada pueden probarse en uno o más ensayos para evaluar el nivel de reducción de la función efectora en la actividad biológica en comparación con el anticuerpo de partida. Por ejemplo, la capacidad del anticuerpo o del polipéptido con una región Fc alterada para unirse al complemento o a receptores Fc (por ejemplo, receptores Fc de la microglía) o con una región bisagra alterada puede evaluarse usando los ensayos divulgados en el presente documento así como cualquiera de los ensayos reconocidos en la técnica. Documento PCT WO 99/58572; Armour y col.,
 35 Molecular Immunology, 40: 585-593 (2003); Reddy y col. J. Immunology 164:1925-1933 (2000); Song y col. Infection and Immunity 70:5177-5184 (2002).

Pueden usarse ensayos competitivos para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo epítipo mediante el reconocimiento de epítopos idénticos o estéricamente solapados o si un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de otro anticuerpo al antígeno. Estos ensayos se conocen en la técnica.
 40 Típicamente, el antígeno se inmoviliza en una placa multipocillo y se mide la capacidad de anticuerpos sin marcar para bloquear la unión de anticuerpos marcados. Los marcadores normales para estos ensayos de competición son marcadores radiactivos o marcadores enzimáticos.

Puede analizarse la eficacia de anticuerpos y polipéptidos que se unen específicamente a Aβ para eliminar el depósito amiloide o para incluir otros efectos beneficiosos, tales como la mejora de la capacidad cognitiva.
 45 Por ejemplo, pueden administrarse anticuerpos o polipéptidos a un animal que tiene la patología de Alzheimer. Diversos modelos animales para la enfermedad de Alzheimer son conocidos en la técnica. Tras la administración pueden analizarse los niveles de placas amiloides compactas y difusas, el comportamiento con respecto a la capacidad cognitiva y la activación de microglía y de micro hemorragias usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en detalles en el Ejemplo 2. Documento PCT WO 2004/032868; Wilcock y col., J. Neurosci. 23:3745-3751 (2003); Wilcock y col., J. Neuroinflammation 1:24
 50 (2004).

Polinucleótidos, vectores y células huésped

55 La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y polipéptidos de la invención (incluyendo un anticuerpo que comprende las secuencias de polipéptidos de las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada mostradas en la Figura 1) y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

Por lo tanto, la invención proporciona polinucleótidos (o composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los siguientes: (a) el anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (b) un fragmento o una región del anticuerpo 6G o sus variantes

mostradas en la Tabla 3; (c) una cadena ligera de un anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (d) una cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (e) una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (f) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (g) la CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo 6G; (h) la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (i) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo 6G o sus variantes mostrada en la Tabla 3; (j) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3; (k) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo 6G o sus variantes mostradas en la Tabla 3 y (l) un anticuerpo que comprende cualquiera de (b) a (k). En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende uno o ambos polinucleótidos de las secuencias mostradas en la ID SEC N° 9 y la ID SEC N° 10.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) y polipéptidos descritos en el presente documento, tales como anticuerpos y polipéptidos que tienen la función efectora alterada. Los polinucleótidos pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas realizaciones, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo 6G como se describe en este documento. En otra realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en este documento. Aún en otras realizaciones, la composición comprende uno o ambos polinucleótidos de las secuencias mostradas en la ID SEC N° 9 y la ID SEC N° 10. Los vectores de expresión y la administración de composiciones de polinucleótidos se describen adicionalmente en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para obtener cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

La divulgación también abarca polinucleótidos complementarios a cualquiera de tales secuencias. Los polinucleótidos pueden ser de cadena sencilla (codificadora o complementaria) o de cadena doble y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de HnARN, que contienen intrones y se corresponden en cuanto a su identidad con una molécula de ADN y con moléculas de ARNm que no contienen intrones. En un polinucleótido de la presente divulgación pueden presentarse secuencias codificadoras o no codificadoras adicionales, pero no necesariamente y un polinucleótido puede estar unido, pero no necesariamente, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos puede comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una porción del mismo) o puede comprender una variante de esta secuencia. Las variantes polinucleotídicas contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de modo que la inmunoreactividad del polipéptido codificado no disminuye con respecto a una molécula inmunoreactiva nativa. El efecto de la inmunoreactividad del polipéptido codificado generalmente puede evaluarse como se describe en el presente documento. Las variantes preferiblemente muestran al menos aproximadamente el 70 % de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80 % de identidad y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 % de identidad con una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo nativo o una porción del mismo.

Se dice que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para la correspondencia máxima como se describe a continuación. Típicamente, las comparaciones entre dos secuencias se realizan comparando las secuencias a través de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", según se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en las que una secuencia puede compararse con otra secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de forma óptima.

El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación puede realizarse usando el programa Megalign en el paquete de software de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc. Madison, WI) usando parámetros por defecto. Este programa realiza varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (editores) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Volumen 5, Supl. 3, pág. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pág. 626-645, Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy,

Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a través de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en el que la porción de la secuencia de polinucleótido o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, normalmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento en comparación con las secuencias de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen bases de ácido nucleico o residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número de posiciones totales en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes también, o alternativamente, pueden ser sustancialmente homólogas a un gen nativo, o a una porción o complemento del mismo. Estas variantes polinucleotídicas son capaces de hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia de ADN que aparece de forma natural codificando un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Las "condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen prelavado en una solución de SSCx5, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), hibridación a 50 °C-65 °C, SSCx5, durante toda la noche; seguido de dos lavados a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de los siguientes: SSC 2x, 0,5X y 0,2x que contiene SDS al 0,1 %.

Según se usa en este documento, "condiciones extremadamente rigurosas" o "condiciones muy rigurosas" son aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015M/dodecil sulfato sódico al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean un agente desnaturante durante la hibridación, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con seroalbúmina bovina al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C o (3) emplean formamida al 50 %, SSCx5 (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1 %, solución de Denhardt x5, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSCx0,2 (cloruro sódico, citrato sódico) y formamida a 55 °C, seguido de un lavado muy riguroso que consistía en SSCx0,1, que contenía EDTA a 55 °C. El experto reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores como la longitud de la sonda y similares.

Los expertos en la materia apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos son portadores de una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, en la presente invención se contemplan específicamente polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso del codon. Adicionalmente, están en el alcance de la presente invención alelos de los genes que comprenden las secuencias de los polinucleótidos proporcionados en el presente documento. Los alelos son genes endógenos están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden tener, pero no necesariamente tienen, una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación con secuencias de bases de datos).

Los polinucleótidos de esta invención pueden obtenerse usando síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Los procedimientos de síntesis química de polinucleótidos se conocen bien en la técnica y no es necesario que se describan en detalle en el presente documento. Un experto en la técnica puede utilizar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para la preparación de polinucleótidos utilizando procedimientos recombinantes, puede insertarse un polinucleótido que comprenda una secuencia deseada dentro de un vector adecuado y a su vez, el vector puede introducirse en una célula huésped adecuada para su replicación y amplificación, como se discute en detalle en este documento. Pueden insertarse polinucleótidos en las células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno mediante captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de este modo puede aislarse de la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989).

Alternativamente, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR se conoce bien en la técnica y se describe en las Patente de EE.UU. N.º 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202,

así como en PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis y col. editores, Birkauswer Press, Boston (1994).

El ARN puede obtenerse usando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe a ARN, a continuación, el ARN puede aislarse usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, como se muestra en Sambrook y col., (1989), por ejemplo.

Los vectores de clonación adecuados pueden construirse de acuerdo con técnicas convencionales o pueden seleccionarse a partir de un gran número de vectores de clonación disponible en la técnica. Mientras que el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se pretende utilizar, generalmente los vectores de clonación útiles tendrán la capacidad para autorreplicarse, pueden poseer una diana única para una enzima de restricción en especial, y/o pueden portar genes de un marcador que pueda usarse para seleccionar clones que contienen el vector. Ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp 19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzaderas, tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponible a partir de casas comerciales, tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Los vectores de expresión generalmente son construcciones polinucleótídicas replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Esto implica que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped bien como episomas o bien como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen pero sin limitaciones plásmidos, vectores víricos, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vectores de expresión descritos en la publicación PCT N.º WO 87/04462. Generalmente, los componentes de vectores pueden incluir, pero sin limitaciones, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción) normalmente también son necesarios uno o más elementos de control de la traducción, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de iniciación de la traducción y codones de parada.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquiera de una cantidad de procedimientos apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro cálcico, cloruro de rubidio, fosfato cálcico, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso tal como virus de la variolovacuna). La elección de la introducción de vector o polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

La invención también proporciona células huésped que comprenden cualesquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Cualesquiera células huésped capaces de sobreexpresar ADN heterólogos puede utilizarse con el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamíferos incluyen pero sin limitaciones células COS, HeLa y CHO. Véase también la publicación PTC N.º WO 87/04462. Las células huésped no de mamífero adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe* o *K. lactis*). Preferiblemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces mayor, más preferiblemente 10 veces mayor, incluso más preferiblemente 20 veces mayor que los del correspondiente anticuerpo o proteína endógenos de interés, si está presente, en las células huésped. El análisis de las células huésped para una unión específica a A β ₁₋₄₀ se efectúa mediante un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o la proteína de interés.

Usos diagnósticos de anticuerpos derivados de 6G y anticuerpos anti-A β que tienen una función efectora alterada

El anticuerpo 6G que se une al extremo C-terminal de A β puede utilizarse para identificar o detectar la presencia o ausencia de A β . Para simplificar, generalmente se hará referencia a 6G o a anticuerpos con el entendimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a A β (tales como polipéptidos) descritas en el presente documento. Generalmente la detección implica poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo descrito en el presente documento que se une a A β y la formación de un complejo entre A β y un anticuerpo (por ejemplo 6G) que se une específicamente a A β . La formación de un complejo tal puede ser *in vitro* o *in vivo*. El término "detección" según se usa en el presente documento incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles medidos) con o sin referencia a un control.

Cualesquiera de una diversidad de procedimientos conocidos pueden utilizarse para la detección incluyendo, pero sin limitaciones, inmunoensayo utilizando anticuerpo que une al polipéptido, por ejemplo mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y similares; y ensayo funcional para el polipéptido codificado, por ejemplo, actividad de unión o ensayo enzimático. En algunas realizaciones, el anticuerpo está marcado de manera detectable. Otras realizaciones se conocen en la técnica y se describen en el presente documento.

Anticuerpos y polipéptidos de la divulgación pueden utilizarse en la detección, diagnóstico y control de una enfermedad, dolencia o trastorno asociado con la expresión alterada o anómala de A β o β APP, tal como la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down. Por tanto, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto un espécimen (muestra) de un individuo sospechoso de tener una expresión alterada o anómala de A β con un anticuerpo o polipéptido de la invención y determinar si el nivel de A β difiere del de una muestra control o de comparación. En otras realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto una muestra de un individuo o determinar el nivel de expresión de A β .

Para aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo puede marcarse con un resto detectable que incluye pero sin limitaciones radioisótopos, marcadores fluorescentes y diversos marcadores de enzima-sustrato. Los procedimientos de conjugación de marcadores a un anticuerpo se conocen en la técnica. En otra realización de la divulgación, los anticuerpos de la invención no necesitan estar marcados y la presencia de los mismos puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une a los anticuerpos de la divulgación.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden emplearse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pág.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Los anticuerpos también pueden utilizarse para ensayos diagnósticos *in vivo*, tales como técnicas de formación de imágenes *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se marca con un radionucleido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I o ^3H) de modo que las células o tejidos de interés pueden localizarse usando inmunocentelleo.

El anticuerpo también puede usarse como reactivo de tinción en patología, siguiendo técnicas bien conocidas en la técnica.

Los anticuerpos anti-A β que tienen una función efectora alterada pueden utilizarse para medir la carga amiloide en el encéfalo para el diagnóstico de un sujeto en riesgo o diagnosticado de EA y para evaluar el progreso de cualquier tratamiento y etapa de la enfermedad. Se ha informado de que la administración periférica de un anticuerpo monoclonal anti-A β da lugar a un aumento rápido en plasma de A β y el grado de este aumento está muy correlacionado con la carga amiloide en el hipocampo y en la corteza. DeMattos y col., *Science* 295:2264-2267 (2002). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-A β que tiene la función efectora alterada se administra a un sujeto y se mide el nivel de A β en el plasma, por medio de lo que un aumento en plasma de A β indica la presencia y/o el nivel de carga amiloide encefálica en el sujeto. Estos procedimientos pueden utilizarse para controlar la eficacia del tratamiento y la etapa de la enfermedad y para determinar la dosis y la frecuencia futuras. Los anticuerpos que tienen la función efectora alterada pueden tener un mejor perfil de seguridad y proporcionar ventajas para estos usos diagnósticos.

Procedimientos para la utilización del anticuerpo anti-A β con fines terapéuticos

Los anticuerpos (incluyendo polipéptidos), polinucleótidos y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse en procedimientos para tratar, prevenir e inhibir el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades asociadas con la expresión de A β o β APP alterada, o con la acumulación o depósito del péptido A β (denominadas colectivamente como "enfermedades asociadas a A β ") tales como el síndrome de Down, la enfermedad de Parkinson, la demencia multi-infarto, el deterioro cognitivo leve, la angiopatía amiloide cerebral, el trastorno vascular causado por el depósito del péptido A β en los vasos sanguíneos (tal como ictus y HCHWA-D), la depresión, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y la demencia con cuerpos de Lewy. tales procedimientos comprenden la administración de los anticuerpos, polipéptidos o polinucleótidos, o una composición farmacéutica al sujeto. En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos se administran a un paciente susceptible de, o de otra manera en riesgo de, enfermedad de Alzheimer (u otra enfermedad asociada a A β) en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones o medicamentos a un paciente sospechoso de, o que sufre ya de una enfermedad tal en cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

La divulgación también proporciona un procedimiento para retrasar el desarrollo de un síntoma asociado con la enfermedad de Alzheimer (o con otra enfermedad asociadas con A β) en un sujeto que comprende administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido o un polinucleótido descrito en el presente documento al sujeto. Los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer incluyen, pero sin limitaciones, anomalías en la memoria, en la capacidad para resolver problemas, en el lenguaje, en el cálculo, en la percepción visoespacial, en el juicio y en el comportamiento.

Esta invención también proporciona procedimientos para inhibir o suprimir la formación de placas amiloides y/o la acumulación de A β en un sujeto comprendiendo administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido o de acuerdo con la presente divulgación un polinucleótido descrito en el presente documento al sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides están en el encéfalo del sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides se encuentran en la vasculatura encefálica del sujeto. En otras divulgaciones, la acumulación de A β se produce en el sistema circulatorio del sujeto.

Esta invención también proporciona procedimientos para reducir las placas amiloides y/o reducir o retardar la acumulación de A β en un sujeto comprendiendo la administración de una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o de acuerdo con la divulgación un polipéptido o un polinucleótido descrito en el presente documento al sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides se encuentran en el encéfalo del sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides se encuentran en la vasculatura cerebral del sujeto. En otras divulgaciones, la acumulación de A β está en el sistema circulatorio del sujeto.

Esta divulgación también proporciona procedimientos para eliminar o aclarar las placas amiloides y/o la acumulación de A β en un sujeto comprendiendo administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o de acuerdo con la divulgación un polipéptido o un polinucleótido descrito en el presente documento al sujeto. En algunas realizaciones, las placas amiloides se encuentran en el encéfalo del sujeto. En algunas divulgaciones, las placas amiloides se encuentran en la vasculatura cerebral del sujeto. En otras divulgaciones, la acumulación de A β se produce en el sistema circulatorio del sujeto.

Esta divulgación también proporciona procedimientos para reducir el péptido A β en un tejido (tal como en el encéfalo), inhibir y/o reducir la acumulación del péptido A β en un tejido (tal como en el encéfalo) e inhibir y/o reducir los efectos tóxicos del péptido A β en un tejido (tal como en el encéfalo) en un sujeto comprendiendo administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido o un polinucleótido descrito en el presente documento al sujeto. El polipéptido A β puede estar en forma soluble, oligomérica o de depósito. La forma oligomérica de A β puede estar compuesta de 2 a 50 polipéptidos de A β , lo que puede ser una mezcla de los péptidos de longitud completa de 1-40 y de 1-42 y/o cualquier versión truncada de estos péptidos.

La divulgación también proporciona procedimientos para mejorar la capacidad cognitiva o invertir el deterioro cognitivo asociado a enfermedades con depósito amiloide de A β en un sujeto, tales como la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo administrar una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un polipéptido o un polinucleótido descrito en este documento al sujeto.

Los procedimientos descritos en este documento (incluyendo profilaxis o terapia) pueden lograrse mediante una única inyección directa en un único punto temporal o en múltiples puntos temporales en un único sitio o en múltiples sitios. La administración también puede ser prácticamente simultánea en múltiples sitios. La frecuencia de administración se puede determinar y ajustar durante el transcurso de la terapia y se basa en la obtención de los resultados deseados. En algunos casos, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua mantenida de anticuerpos (incluyendo polipéptidos), polinucleótidos y composiciones farmacéuticas de la divulgación. En la técnica se conocen diversas formulaciones y dispositivos para conseguir liberación mantenida.

Los pacientes, sujetos o individuos incluyen mamíferos, tales como seres humanos, animales bovinos, equinos, caninos, felinos, porcinos y ovinos. Preferiblemente el sujeto es un ser humano y puede o no estar aquejado por una enfermedad o mostrar actualmente síntomas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquier persona está en riesgo de sufrir la enfermedad de Alzheimer si él o ella vive lo suficiente. Por tanto, los procedimientos actuales pueden administrarse a la población en general como profilaxis sin la necesidad de evaluación alguna del riesgo del paciente. Los presentes procedimientos son útiles para individuos que tiene un riesgo genético conocidos de enfermedad de Alzheimer. Estos individuos incluyen a aquellos que tienen familiares que han sufrido esta enfermedad y a aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos del riesgo de sufrir la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, especialmente mutaciones en la posición 717 y en las posiciones 670 y 671, denominadas como las mutaciones Hardy y sueca, respectivamente (véase Hardy (1997) Trends Neurosci. 20:154-9). Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2 y la ApoE4, antecedentes familiares de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que actualmente padecen de la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por su demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, de varias pruebas diagnósticas están disponibles para identificar a los individuos que presentan EA. Estas incluyen la medida de los niveles de CSF tau y A β 42. Los niveles elevados de tau y reducidos de A β 42 significan la presencia de EA. Los individuos que sufren la enfermedad de Alzheimer también pueden ser diagnosticados mediante los criterios de la ADRDA (Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y

Trastornos Relacionados). En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede iniciarse a cualquier edad (por ejemplo 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, no es necesario iniciar el tratamiento hasta que el paciente alcance los 40, 50, 60 o 70. Típicamente el tratamiento supone dosis múltiples durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede someterse a seguimiento de diversas formas conocidas en la técnica a lo largo del tiempo. En el caso de pacientes con posible síndrome de Down, el tratamiento puede iniciarse antes del nacimiento administrando un agente terapéutico a la madre o inmediatamente después del parto.

La composición farmacéutica que puede usarse en los procedimientos anteriores incluye cualquiera de los anticuerpos, polipéptidos y/o polinucleótidos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo G6 o sus variantes mostradas en la Tabla 3. En algunas realizaciones el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido A β y comprende una región constante que tiene la función efectora alterada.

Administración y dosis

El anticuerpo preferiblemente se administra al mamífero en un vehículo, preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro editor, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Edición. Mack Publishing. 2000. Típicamente, en la formulación se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer que dicha formulación sea isotónica. Ejemplos del vehículo incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución preferiblemente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación mantenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será patente para los expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferidos dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y de la concentración de anticuerpo que se administra.

El anticuerpo puede administrarse al mamífero mediante inyección (por ejemplo, sistémica, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraportal, intracerebral, intracerebroventricular e intranasal) o mediante otros procedimientos, tales como infusión, lo que asegura su administración a través del torrente sanguíneo de una forma eficaz. El anticuerpo también puede administrarse mediante técnicas de perfusión aislada, tales como perfusión de tejido aislado, para ejercer efectos terapéuticos locales. Se prefiere la inyección intravenosa.

Las dosis y programas eficaces para administrar el anticuerpo pueden determinarse empíricamente y realizar tales determinaciones está dentro de la experiencia de la técnica. Los expertos en la materia entenderán que la dosis de anticuerpo que debe administrarse variará dependiendo de, por ejemplo, el mamífero que recibirá el anticuerpo, la vía de administración, el tipo de anticuerpo particular usado y otros fármacos que se estén administrando al mamífero. La orientación para seleccionar dosis apropiadas de anticuerpo se encuentra en la bibliografía sobre utilidades terapéuticas de los anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone y col., editores, Noyes Publications, Parh Ridge, N.J. 1985, Cap. 22, pág. 303-357; Smith y col., Antibodies in Human diagnosis and therapy, Haber y col., editores. Raven Press, Nueva York, 1977, pág. 365-389. Una dosis diaria típica del anticuerpo utilizado solo podría oscilar de aproximadamente 1 μ g/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más al día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Generalmente, puede usarse cualquiera de las siguientes dosis: se administra una dosis de al menos aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 750 μ g/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 500 μ g/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 250 μ g/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 100 μ g/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 50 μ g/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 μ g/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 1 μ g/kg de peso corporal, o más. Los anticuerpos pueden administrarse a dosis más bajas o menos frecuente al inicio del tratamiento para prevenir posibles efectos adversos, tales como angiopatía amiloide cerebral (AAC) pasajera.

En algunas realizaciones, puede presentarse más de un anticuerpo. Tales composiciones pueden contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco anticuerpos diferentes (incluyendo polipéptidos) de la divulgación.

El anticuerpo también puede administrarse al mamífero en combinación con cantidades eficaces de uno o más agentes terapéuticos diferentes. El anticuerpo puede administrarse de forma secuencial o simultánea con el uno o más agentes terapéuticos diferentes. Las cantidades de anticuerpo y agente terapéutico dependen, por ejemplo, del tipo de fármaco que se está usando, la patología que se está tratando y el programa y vías de administración pero generalmente deben ser menores que si cada uno se utilizaba individualmente.

Tras la administración del anticuerpo al mamífero, puede someterse a seguimiento la afección fisiológica del

mamífero de diversas formas bien conocidas para el experto.

Los principios de administración y dosificación anteriores pueden adaptarse para los polipéptidos descritos en este documento.

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un polipéptido descrito en el presente documento también puede usarse para la administración y expresión del anticuerpo o del polipéptido en una célula deseada. Es patente que puede usarse un vector de expresión para dirigir la expresión del anticuerpo. El vector de expresión puede administrarse por vía sistémica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal, dérmico o mediante inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, pistola de partículas o administración cateterizada y administración tópica. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse las patentes de EE.UU. N.º 6.436.908; 6.413.942 y 6.376.471.

También puede utilizarse la administración dirigida de composiciones terapéuticas que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención. Las técnicas de administración de ADN mediada por receptor se describen, por ejemplo, en Findeis y col., Trends Biothechnol, (1993) 11:202; Chiou y col., Gene Therapeutics Methods and Applications of Direct Gene Transfer (J. A. Wolf, editores) (1994); Wu y col., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu y col., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden usarse durante un protocolo de terapia génica intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos de la presente divulgación pueden administrarse usando vehículos de administración de genes. El vehículo de administración de genes puede ser de origen vírico o no vírico (véanse en general, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994), 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185 y Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148). La expresión de tales secuencias codificadoras puede inducirse usando promotores de mamíferos endógenos o promotores heterólogos. La expresión de la secuencia codificadora puede ser constitutiva o regulada.

Los vectores basados en virus para la administración de un polinucleótido deseado y para la expresión en una célula deseada se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de vehículos basados en virus incluyen, pero sin limitaciones, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N.º WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; patentes de EE.UU. N.º 5.219.740; 4.777.127; patente del Reino Unido N.º 2.200.651 y EP 0 345 242), vectores basados en alfa virus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y vectores de virus adenoasociados (VAA) (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N.º WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). Puede emplearse también la administración de ADN unido a adenovirus muertos según se describe en Curiel, Gene Ther. (1992) 3:147.

Pueden también emplearse vehículos y procedimientos de administración no víricos, incluyendo, pero sin limitaciones, ADN condensado policatiónico unido o no a un adenovirus solo muerto (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147), ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células vehículo para la administración a células eucariotas (véanse, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 5.814.482; publicaciones PCT N.º WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763 y WO 97/42338) y neutralización de la carga nucleica o fusión con membranas celulares. Se puede emplear también ADN desnudo. Ejemplos de procedimientos de introducción de ADN desnudo se describen en la publicación PCT N.º WO 90/11092 y en la patente de EE.UU. N.º 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos para la administración de genes se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.422.120, en las publicaciones PCT N.º WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445 y EP 0 524 968. Aproximaciones adicionales se describen en Philip. Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411 y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:1581.

Kits

La divulgación también proporciona artículos fabricados y kits que contienen materiales útiles para tratar patologías tales como la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades asociadas a Aβ (tales como el síndrome de Down, la enfermedad de Parkinson, la demencia multi-infarto, el deterioro cognitivo leve, la angiopatía amiloide cerebral, el trastorno vascular causado por el depósito del péptido Aβ en los vasos sanguíneos (tal como ictus y HCHWA-D)) o detectar o purificar Aβ o βAPP. El artículo fabricado comprende un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que tiene un agente activo que es eficaz para tratar dolencias

patológicas o para detectar o purificar A β o β APP. El agente activo en la composición es un anticuerpo y preferiblemente, comprende anticuerpos monoclonales específicos de A β o β APP. En algunas realizaciones, el agente activo comprende anticuerpo 6G o cualesquiera anticuerpos o polipéptidos derivado del anticuerpo 6G. En algunas realizaciones, el agente activo comprende un anticuerpo o polipéptido anti-A β descrito en el presente documento que tiene la función efectora alterada. En algunas realizaciones, el anticuerpo o polipéptido anti-A β comprende una región constante de la cadena pesada, en la que la región constante tiene una función efectora alterada. La etiqueta del recipiente indica que la composición se usa para tratar patologías tales como la enfermedad de Alzheimer o para detectar o purificar A β o β PAA y también puede indicar direcciones para su uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente.

La divulgación también proporciona kits que comprenden cualquiera de los anticuerpos (tales como 6G), polipéptidos o polinucleótidos descritos en este documento. En algunas realizaciones, el kit de la invención comprende el recipiente descrito anteriormente. En otras realizaciones, el kit de la invención comprende el recipiente, descrito anteriormente y un segundo recipiente que comprende un tampón. Además puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista del vendedor y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y folletos médicos con las instrucciones para realizar cualesquiera procedimientos descrito en el presente documento (tales como procedimientos para tratar la enfermedad de Alzheimer y procedimientos para inhibir o reducir la acumulación del péptido A β en el encéfalo). En los kits a usarse para detectar o purificar A β o β APP, el anticuerpo típicamente está marcado con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones (descritas en este documento) para usar en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, en el contexto del uso como un medicamento y/o del uso para la fabricación de un medicamento.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar, la invención.

25 Ejemplos

Ejemplo 1. Determinación de la afinidad de unión del anticuerpo 6G y sus variantes

A. Procedimientos generales

Los siguientes procedimientos generales se utilizaron en este ejemplo y en otros ejemplos.

Vector de expresión utilizado en la caracterización del clon

La expresión del fragmento Fab de los anticuerpos estaba sometida al control de un promotor lacZ inducible por IPTG similar al descrito en Barbas (2001), Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pág. 2.10. Vector pComb3X), sin embargo, las modificaciones incluían la adición y expresión de los siguientes dominios adicionales: el dominio constante de la cadena ligera Kappa humana y el dominio constante C_H1 de la inmunoglobulina humana IgG2a, la región C de la cadena gamma 2 de la Ig, número de acceso de proteína P01859; cadena ligera kappa de inmunoglobulina (*Homo sapiens*), número de acceso de proteína CAA09181.

Preparación de Fab a pequeña escala

La expresión a pequeña escala de Fab en placas de 96 pocillos se realizó como sigue. Empezando con una *E. coli* transformada con una biblioteca de Fab, las colonias se recogieron para inocular tanto una placa principal (agar LB + Ampicilina (50 μ g/ml) + glucosa al 2 %) como una placa de trabajo (2 ml/pocillo, 96 pocillos/placa que contienen 1,5 ml de LB + Ampicilina (50 μ g/ml) + glucosa al 2 %). Ambas placas se cultivaron a 30 °C durante 8 a 12 horas. La placa principal se conservó a 4 °C y las células de la placa de trabajo se centrifugaron a 5.000 rpm y se resuspendieron con 1 ml de LB + Ampicilina (50 μ g/ml) + IPTG 1 mM para inducir la expresión de Fab. Las células se recogieron mediante centrifugación después de un tiempo de expresión de 5 h a 30 °C, a continuación las células se resuspendieron en 500 μ l de tampón HBS-EP (tampón HEPES 100 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 al 0,005 %). La lisis de las células resuspendidas en HPS-EP se logró mediante un ciclo de congelación (-80 °C) y después descongelación a 37 °C. Los lisados celulares se centrifugaron a 5.000 rpm durante 30 min para separar los residuos celulares de los sobrenadantes que contienen los Fab. A continuación los sobrenadantes se inyectaron en el aparato de resonancia de plasmón BIAcore para obtener la información de afinidad para cada Fab. Los clones expresando los Fab se recuperaron de la placa original para secuenciar el ADN y para la producción de Fab a gran escala y su caracterización detallada como se describe a continuación.

Preparación de Fab a gran escala

Para obtener los parámetros cinéticos detallados, se expresan los Fab y se purifican de cultivos grandes. Matrices Erlenmeyer que contienen 200 ml de LB + Ampicilina (50 μ g/ml) + glucosa al 2 % se inocularon con

5 ml de cultivo durante toda la noche a partir de un clon de *E. coli* que expresaba el Fab seleccionado. Los clones se incubaron a 30 °C hasta obtener una D.O._{550 nm} de 1,0 y a continuación se indujeron sustituyendo el medio por 200 ml de LB + Ampicilina (50 µg/ml) + IPTG 1 mM. Después de un tiempo de expresión de 5 h a 30° C, las células se recogieron por centrifugación y a continuación se resuspendieron en 10 ml de PBS (pH 8). La lisis de las células se obtuvo mediante dos ciclos de congelación/descongelación (a -80 °C y 37 °C, respectivamente). Los sobrenadantes de los lisados celulares se cargaron en columnas de sefarosa ultrarrápida Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA) equilibradas en PBS, pH 8, a continuación se lavaron con 5 volúmenes de columna de PBS, pH 8. Los Fab individuales eluyeron en las diferentes fracciones con PBS (pH 8) + imidazol 300 mM. Las fracciones que contienen los Fab se agruparon y dializaron en PBS, cuantificándose a continuación mediante ELISA anterior a la caracterización por afinidad.

Preparación de un anticuerpo completo.

Para la expresión de anticuerpos completos, se clonaron las regiones variables de la cadena pesada y ligera en vectores de expresión de mamíferos y se transfectaron usando lipofectamina en células HEK 293 para una expresión transitoria. Los anticuerpos se purificaron usando proteína A y procedimientos convencionales.

15 El vector pDb.6G.hFc2a es un vector de expresión que comprende la cadena pesada del anticuerpo 6G y es adecuado para la expresión transitoria o estable de la cadena pesada. El vector pDb.6G.hFc2a tiene secuencias nucleotídicas que se corresponden con las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 1 a 612); un intrón sintético (nucleótidos 619 a 1.507); la región que codifica DHFR (nucleótidos 707 a 1.267); el péptido señal de la hormona de crecimiento humano (nucleótidos 1.525 a 1.602); la región variable de la cadena pesada de 6G; la región constante de la cadena pesada de la IgG2a humana conteniendo las mutaciones siguientes: A330P331 a S330S331 (los aminoácidos se numeran en referencia a la secuencia de la IgG2a de tipo silvestre; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); la señal de poliadenilación tardía de SV40; la región potenciadora de SV40; la región del fago f1 y la región codificadora de la beta lactamasa (AmpR).

25 El vector pEb.6G.hK es un vector de expresión que comprende la cadena ligera del anticuerpo 6G y es adecuado para la expresión transitoria de la cadena ligera. El vector pEb-6G-hK tenía las secuencias nucleotídicas que se corresponden con las regiones siguientes: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 1 a 612); el intrón EF-1 humano (nucleótidos 619 a 1.142); el péptido señal de la hormona de crecimiento humano (nucleótidos 1.173 a 1.150); la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 6G; la región constante de la cadena kappa humana; la señal de poliadenilación tardía de SV40; la región potenciadora del SV40; la región de fago f1 y la región codificadora de beta lactamasa (AmpR).

Ensayo BIAcore

Las afinidades del anticuerpo monoclonal 6G se determinaron usando el sistema de resonancia de plasmón superficial (RPS) BIAcore3000™ (BIAcore, INC, Piscaway, NJ). Una forma de determinar la afinidad era la inmovilización de 6G en el chip CM5 y medir las cinéticas de unión del péptido Aβ₁₋₄₀ u otros péptidos Aβ al anticuerpo. Los chips de CM5 se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El anticuerpo 6G o sus variantes se diluyeron en acetato sódico 10 mM, pH 4,0 o 5,0 y se inyectaron sobre el chip activado a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando un tiempo de flujo variable a lo largo de los canales individuales del chip, se logró un intervalo de densidad del anticuerpo: 1.000 a 2.000 o 2.000 a 3.000 unidades de respuesta (UR). El chip se bloqueó con etanolamina. Los estudios de regeneración mostraban que una solución que contenía 2 volúmenes de tampón de elución PIERCE y 1 volumen de NaCl 4 M eliminaba de forma eficaz la unión al péptido Aβ, mientras que se mantenía la actividad de 6G en el chip durante aproximadamente 200 inyecciones. El tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005 %) se usó como tampón de desarrollo para todos los ensayos BIAcore. Las diluciones seriadas (de 0,1 a 10 veces la K_D estimada) del péptido sintético Aβ₁₋₄₀ o de otras muestras de péptido Aβ se inyectaron durante 1 min a 100 µl/min y se permitieron tiempos de disociación de 10 min. Las velocidades de la cinética de asociación (K_{on}) y de disociación (K_{off}) se obtuvieron simultáneamente ajustando los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B (1994) Methods Enzymology 6, 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de equilibrio de disociación (K_D) se calcularon como K_{off}/K_{on}.

Alternativamente, la afinidad se determinó inmovilizando el péptido Aβ₁₋₄₀ u otros péptidos Aβ en un chip SA y midiendo las cinéticas de unión del Fab de 6G y Fab de variantes de 6G al péptido Aβ inmovilizado. Las afinidades del fragmento Fab de 6G y los fragmentos Fab de sus variantes se determinaron mediante un sistema de resonancia de plasmón superficial (RPS) (BIAcore, Inc., Piscaway, NJ). Los chips SA (estreptavidina) se usaron según las instrucciones del proveedor. El péptido Aβ biotinilado se diluyó en HBS-EP (Hepes 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 al 0,005 %) y se inyectó sobre el chip a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando un tiempo de flujo variable a lo largo de los canales individuales del chip, se lograron dos intervalos de densidad de antígeno: de 100 a 400 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y de 500 a 2.000 UR para los estudios de concentración y análisis. Los estudios

de regeneración mostraban que el ácido fosfórico 100 mM (también podría ir seguido de una solución que contenía 2 volúmenes de NaOH 50 mM y un volumen de etanol al 70 %) eliminaba de forma eficaz el Fab manteniendo mientras la actividad del péptido A β en el chip durante más de 200 inyecciones. El tampón HBS-EP se usó como tampón de desarrollo para todos los ensayos BIAcore. Las diluciones seriadas (de 0,1 a 10 veces la K_D estimada) de las muestras del Fab purificado se inyectaron durante 2 min a 100 μ l/min y se permitieron tiempos de disociación de 10 min. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinaron mediante ELISA y/o electroforesis en SDS-PAGE usando un Fab patrón de concentración conocida (determinada mediante análisis de aminoácidos). Las velocidades de cinética de asociación (K_{on}) y de disociación (K_{off}) se obtuvieron simultáneamente ajustando los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 606, 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de equilibrio de disociación (K_D) se calcularon como K_{off}/K_{on} .

Ensayo de elisa

ELISA se utilizó para medir la unión del anticuerpo 6G y sus variantes a péptidos A β no biotilado. Las placas *maxisorp* de NUNC se recubrieron con 2,5 μ g/ml de péptidos A β en PBS pH 7,4 durante más de una hora a 4 °C. Las placas se bloquearon con BSA al 1 % en tampón PBS pH 7,4. El anticuerpo primario (a partir de los sobrenadantes celulares, suero que contiene anticuerpo anti-A β o anticuerpo completo purificado o Fab a una dilución deseada) se incubó con los péptidos A β inmovilizados durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se incubaron con un anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-cadena kappa humana de cabra conjugado con HRP (MP Biomedicals, 55233) a una dilución 1:5.000. Después de lavar, el anticuerpo secundario unido se midió mediante la adición del sustrato TMB (KPL, 50-76-02, 50-65-02). La reacción de HRP se detuvo añadiendo ácido fosfórico 1M y se midió la absorbancia a 450 nM.

Para medir la unión del anticuerpo 6G y de sus variantes a péptidos A β biotilados se utilizó ELISA. Las placas *maxisorp* de NUNC se recubrieron con 6 μ g/ml de estreptavidina (Pierce, 21122) en PBS pH 7,4 durante más de una hora a 4 °C. Las placas se bloquearon con BSA al 1 % en tampón PBS pH 7,4. Después de lavar, los péptidos A β biotilados en PBS pH 7,4 se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (a partir de los sobrenadantes celulares, suero que contiene anticuerpo anti-A β o anticuerpo completo purificado o Fab a una dilución deseada) se incubó con los péptidos A β inmovilizados durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se incubaron con anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-cadena kappa humana de cabra conjugado con HRP (MP Biomedicals, 55233) a una dilución 1:5.000. Después de lavar, el anticuerpo secundario unido se midió añadiendo el sustrato TMB (KPL, 50-76-02, 50-65-02). La reacción de HRP se detuvo añadiendo ácido fosfórico 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm.

B. Afinidad de unión del anticuerpo 6G y sus variantes a los péptidos A β_{1-40} , A β_{1-42} y otros péptidos A β

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo 6G se muestran en la Figura 1. La afinidad de unión del anticuerpo 6G a A β_{1-40} , A β_{1-42} y A β_{22-37} determinado usando BIAcore descrito anteriormente se muestra a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Afinidad de unión del fragmento Fab del anticuerpo 6G.

	K_{on} (l/Ms)	K_{off} (l/s)	K_D (nM)
A β_{1-40} biotilado inmovilizado en un chip de estreptavidina, el Fab de 6G se hace fluir sobre él	$3,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^{-4}$	2
A β_{1-42} biotilado inmovilizado en un chip de estreptavidina, el Fab de 6G se hace fluir sobre él	$1,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^{-3}$	80
A β_{22-37} biotilado inmovilizado en un chip de estreptavidina, el Fab de 6G se hace fluir sobre él	$3,6 \times 10^5$	$3,9 \times 10^{-3}$	11

Las secuencias de aminoácidos de las variantes de 6G se muestran a continuación en la Tabla 3. Todas las sustituciones de aminoácidos de las variantes mostradas en la Tabla 3 se describen en relación con la secuencia de 6G. La unión relativa de las variantes 6G también se muestra en la Tabla 3. La unión se determinó mediante ELISA descrito anteriormente con A β_{1-40} o A β_{1-42} no biotilados inmovilizados en la superficie de una placa de ELISA.

ES 2 597 403 T3

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos y datos de unión para las variantes del anticuerpo 6G.

Datos de unión de las variantes de mutación de la cadena pesada de 6G mediante ELISA							ELISA A450	
número del clon	mutaciones						A β ₁₋₄₀	A β ₁₋₄₂
6G	F99	D100	N101	Y102	D103	R104	2,55	0,95
1A	Y						1,60	0,26
1B	M						0,37	0,22
1G	L						0,51	0,21
2G	P						0,30	0,50
3E	C						0,26	0,40
4G		S					1,41	0,30
5D		N					1,52	0,39
6A		T					0,86	0,31
7B			S				0,44	0,27
7D			C				0,23	0,31
8H			H				0,21	0,19
9E			R				0,22	0,26
10A				F			1,85	0,34
10E				L			0,41	0,24
10G				I			0,63	0,22
11D				M			0,29	0,24
2F					P		1,89	0,38
3A					A		1,16	0,28
3B					R		1,43	0,43
3C					G		2,30	0,76
4A						G	2,17	0,40
4B						F	2,48	0,71
4D						Q	2,45	1,00
6F						S	2,28	0,62

Datos de unión de las variantes de mutación de la cadena ligera de 6G mediante ELISA										ELISA A450	
número del clon	mutaciones									A β ₁₋₄₀	A β ₁₋₄₂
6G	Q93	Q94	S95	K96	E97	F98	P99	W100	S101	2,49	0,61
2H	K									0,07	0,13
3A	P									0,08	0,13
4F	S									2,00	0,30
5B		G								0,09	0,14
7E		R								0,09	0,18
7F		K								0,12	0,19
10E			L							0,08	0,12
1A				N						2,02	0,32
1C				F						0,05	0,05
4A				A						2,09	0,28
4G				F						1,07	0,28
5H					R					2,06	0,85
6C					G					0,05	0,05
6D					T					2,41	1,34
6E					P					0,12	0,20
8G					V					2,60	0,90

Ejemplo 2: Caracterización del epítipo del péptido A β que se une al anticuerpo 6G

5 Para determinar el epítipo del péptido A β que es reconocido por el anticuerpo 6G, se utilizó un análisis de unión de tipo ELISA. Se inmovilizaron diversos péptidos A β (Global Peptide Services, CO) en una placa de ELISA. La unión del anticuerpo 6G completo (a 20 nM) a los péptidos A β inmovilizados se determinó mediante ELISA como se ha descrito anteriormente. A continuación, en la Tabla 5 se muestran las secuencias de aminoácidos de A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃. Como se muestra en la Figura 2, el anticuerpo 6G se une a los péptidos A β 17-40, 17-42, 22-35, 28-40, 1-38, 1-40, 1-42, 1-43 y 28-42; pero se une a 28-42 mucho más débilmente que a los otros péptidos A β . El anticuerpo 6G no se une a los péptidos A β 1-16, 1-28 y 33-40. Por tanto, el anticuerpo 6G se une al extremo C-terminal de diversos péptidos A β truncados, por ejemplo, 22-35, 1-38, 1-40, 1-42 y 1-43.

15 La Tabla 4 dada a continuación muestra la comparación de la afinidad de unión de 6G a A β ₁₋₄₀ con respecto a otros péptidos A β medida mediante la K_{off} (l/s) usando un ensayo BIAcore. El anticuerpo 6G se une a A β ₁₋₄₀ con una afinidad mayor en comparación con otros péptidos, con una afinidad significativamente menor por A β ₁₋₄₀ truncados (tales como 1-36, 1-37, 1-38 y 1-39), A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃. Esto indica que la cadena lateral o la estructura principal del aminoácido 40 (Valina) del A β está implicado en la unión de 6G a A β ₁₋₄₀ y la unión se reduce significativamente (por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 a aproximadamente 250 veces de pérdida de afinidad) en ausencia de este aminoácido. La unión con una afinidad menor al extremo carboxilo terminal amidado de A β ₁₋₄₀ indica que la unión de 6G a A β ₁₋₄₀ implica pero no es dependiente del C-terminal libre de A β ₁₋₄₀. La menor afinidad de unión a A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃ puede deberse a diferencias conformacionales entre el monómero formado por A β ₁₋₄₀ y el formado por A β ₁₋₄₂ o A β ₁₋₄₃. Se ha demostrado que el monómero de A β ₁₋₄₂ tiene una conformación diferente a la del monómero de A β ₁₋₄₀ en solución. Véanse, la estructura del monómero coordinado de A β ₁₋₄₂ que se muestra en el Banco de datos de proteínas (archivos bdp) con n.º de

acceso 1IYT; y la estructura del monómero coordinado de A β ₁₋₄₀ que se muestra en el Banco de datos de proteínas (archivos bdp) con n.º de acceso 1BA6 y 1BA4.

Tabla 4

Fragmento péptido A β	del	K _{off} (l/s)	K _{off} del péptido A β /K _{off} del A β ₁₋₄₀ (n.º de veces de pérdida de afinidad)
1-28		-	
1-43		Muy baja unión	
22-35		0,0285	215,9
1-36		0,0205	155,3
1-37		0,0149	112,8
1-38		9,3x10 ⁻³	70,4
1-39		7,92x10 ⁻³	60,0
17-42		0,0465	352,2
1-42		1,9x10 ⁻³	14,4
28-42		3,37x10 ⁻³	25,5
28-40-NH2#		3,62x10 ⁻³	27,4
28-40		6,4x10 ⁻⁴	4,8
17-40		2,15x10 ⁻⁴	1,6
1-40		1,32x10 ⁻⁴	1
Péptido que se hizo fluir como analito sobre un chip CM5 con el anticuerpo monoclonal 6G (ligando) inmovilizado mediante la reacción química del residuo amino. #péptido con el extremo carboxilo terminal amidado.			

- 5 El mapeo de epítomos del anticuerpo 6G se realizó mediante un ensayo de ELISA. Se inmovilizaron diversos péptidos A β 15-mero o 10-mero biotinilados (estos péptidos tienen glicina añadida al extremo C-terminal) en placas recubiertas con estreptavidina. El anticuerpo 6G (de 2,5 μ g/ml a 10 μ g/ml) se incubó con los péptidos inmovilizados y la unión se midió como se ha descrito anteriormente. Según se muestra en la Figura 3, el anticuerpo 6G se une a los péptidos A β en los aminoácidos 20-34, 21-35, 22-36, 23-37, 24-38, 25-39 y 25-34 con una glicina en el extremo C-terminal; pero no se une a los péptidos A β con los aminoácidos 19-33, 26-40, 27-41, 24-33 y 26-35 que tienen una glicina en el extremo C-terminal de estos péptidos. Esto sugiere que el epítomo de anticuerpo 6G incluye los aminoácidos del 25 al 34.

En base a los datos mostrados anteriormente, el epítomo al que se une el anticuerpo 6G parece incluir los aminoácidos 25-34 y 40. La Figura 4 es un gráfico esquemático que muestra el epítomo del anticuerpo 6G.

- 15 Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de los péptidos β -amiloides

1-40 (TS)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (ID SEC N° 15)
1-42 (TS)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (ID SEC N° 16)
1-43 (TS)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (ID SEC N° 17)

B. El anticuerpo 6G no se une a APP

Para determinar si 6G se une a proteínas precursores amiloides (APP), se determinó la unión de 6G a células transfectadas con APP de tipo silvestre. Las células HEK293 se transfectaron con un ADNc que codificaba la

5 proteína precursora amiloide humana de tipo silvestre. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se incubaron en hielo durante 45 minutos con anticuerpos monoclonales anti-A β ₁₋₁₆ (m2324) o con 6G (5 μ g/ml en DMEM con SFT del 10 %). A continuación las células se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos y se fijaron con PFA al 4 %. Las células se lavaron otra vez tres veces con PBS y la unión al anticuerpo se detectó con un anticuerpo secundario de cabra anti ratón conjugado con Cy3 (dilución de 1:500) de Jackson Immunoresearch en un microscopio de fluorescencia.

Según se muestra en la Figura 5, el anticuerpo anti-A β ₁₋₁₆, que reconoce los epítomos del extremo N-terminal de A β , mostraba una unión significativa a las proteínas precursoras de APP expresadas en células. Por el contrario, 6G no se unía a las células que expresaban APP.

10 **Ejemplo 3. Caracterización del epítomo del péptido A β que se une al anticuerpo 2294.**

El anticuerpo 2294 es un anticuerpo murino obtenido tras la inmunización de un ratón con A β ₁₋₄₀. Este anticuerpo se describe en el documento US 2004/0146512 y el documento WO 04/032868.

15 La afinidad de unión del anticuerpo 2294 a A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ o A β ₂₂₋₃₇ se midió usando BIAcore según se ha descrito anteriormente. La tabla 6 a continuación muestra la afinidad del fragmento Fab del anticuerpo 2294 a diversos péptidos A β .

Tabla 6. Afinidad de unión del fragmento Fab del anticuerpo 2294

	K _{on} (l/Ms)	K _{off} (l/s)	K _D (nM)
A β ₁₋₄₀ biotinilado inmovilizado en un chip de estreptavidina, el Fab 2294 se hace fluir sobre él	6,6 x 10 ⁻⁴	3,95 x 10 ⁻⁴	6
A β ₁₋₄₂ biotinilado inmovilizado en un chip de estreptavidina, el Fab 2294 se hace fluir sobre él	1,1 x 10 ⁻⁴	4,87 x 10 ⁻³	400
A β ₂₂₋₃₇ biotinilado inmovilizado en un chip de estreptavidina, el Fab 2294 se hace fluir sobre él	5 x 10 ⁻³	0,049	10.000

20 El mapeo de epítomos del anticuerpo 2294 se realizó mediante un ensayo de tipo ELISA. Se inmovilizaron diversos péptidos A β de 15-mero o 10-mero biotinilados (estos péptidos tiene una glicina añadida al extremo C-terminal) a placas recubiertas con estreptavidina. Placas maxisorp de NUNC se recubrieron con estreptavidina a una concentración de 6 μ g/ml (Pierce, 21122) en PBS pH 7,4 durante más de 1 h a 4 °C. Las placas se bloquearon con BSA al 1 % en tampón PBS a pH 7,4. Después de lavar, los péptidos A β biotinilados en PBS a pH 7,4 se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo 2294 (de 2,5 μ g/ml a 10 μ g/ml) se incubó con los péptidos A β inmovilizados durante 1 hora a temperatura ambiente.
 25 Después de lavar, las placas se incubaron con un anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-cadena kappa humana de cabra conjugado con HRP (MP Biomedicals, 55233) a una dilución 1:5.000. Después de lavar, el anticuerpo secundario unido se midió mediante la adición del sustrato TMB (KPL, 50-76-02, 50-65-02). La reacción de HRP se detuvo añadiendo ácido fosfórico 1M y se midió la absorbancia a 450 nM. Como se muestra en la Figura 6, el anticuerpo 2294 se une a los péptidos A β con los aminoácidos 20-34, 21-35, 22-36, 23-37, 24-38, 25-39, 26-40 y 25-34 con una glicina en el extremo C-terminal, pero no se une a los péptidos A β con los aminoácidos 19-33, 27-41, 24-33 y 27-35 que tienen una glicina en el extremo C-terminal de estos péptidos. Esto sugiere que el epítomo de unión del anticuerpo 2294 incluye los aminoácidos del 26 a 34.

35 Para determinar adicionalmente el epítomo en el péptido A β que se reconoce por el anticuerpo 2294, se utilizó análisis de unión de tipo ELISA. Diversos péptidos A β (Global Peptide Services, CO) se inmovilizaron en una placa de ELISA. La unión del anticuerpo completo 2294 (a 20 nM) a los A β inmovilizados se determinó mediante ELISA como se describe anteriormente. El anticuerpo 2294 se une a los péptidos A β 17-40, 17-42, 28-40, 1-38, 1-40, 1-42 y 1-43. El anticuerpo 2294 no se une a los péptidos A β 1-16, 1-28, 28-42, 22-35 y 33-40. Por tanto, el anticuerpo 2294 se une al extremo C-terminal de varios péptidos A β truncados, por ejemplo, 1-38, 1-40, 1-42 y 1-43.

40 La Tabla 7 a continuación muestra una comparación de la unión de 2294 a A β ₁₋₄₀ con respecto a otros péptidos A β medida mediante el ensayo BIAcore. El anticuerpo 2294 (anticuerpo completo) muestra la unión más potente con A β ₁₋₄₀ en comparación con otros péptidos, con una unión significativamente menor a A β ₁₋₄₀ truncados (tales como, 1-36, 1-37, 1-38 y 1-39), A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃. Esto indica que la cadena lateral o la estructura principal del aminoácido 40 (Valina) de A β está implicada en la unión de 2294 a A β ₁₋₄₀; y la unión se reduce significativamente en ausencia de este aminoácido.
 45

Tabla 7

Fragmento del péptido A β	Unión
1-28	-
1-43	-
22-35	-
1-36	+
1-37	+
1-38	++
1-39	++
17-42	+++
1-42	+++
17-40	++++
1-40	++++
"-“indica que no hay unión; “+” indica una unión muy baja; “++” indica una unión media; “+++” indica una unión fuerte y “++++” indica una unión muy fuerte.	

5 En base a los datos mostrados anteriormente, el epítipo que se une al anticuerpo 2294 parece incluir los aminoácidos 26-34 y 40. Como se muestra en la Figura 6, el anticuerpo 2294 se une a un epítipo muy similar al del anticuerpo 6G. Sin embargo, la unión del anticuerpo 6G depende en menor medida del aminoácido 40 que la del anticuerpo 2294.

10 Se realizaron experimentos de competición de unión de anticuerpos entre 2294, 6G, 2H6 y 2289 usando el ensayo BIAcore. El anticuerpo 2H6 es un anticuerpo que se une a A β ₃₃₋₄₀ y se describe en la solicitud provisional de patente de EE.UU. N.º 60/653.197, presentada el 14 de febrero de 2005. El anticuerpo 2289 es un anticuerpo que se une a A β ₁₆₋₂₈ y se describe en la publicación de EE.UU. N.º 2004/014512 y en la PCT WO 04.032868. Los experimentos de competición se realizaron usando un ensayo BIAcore. Los anticuerpos 2294, 6G, 2H6 y 2289 se inmovilizaron en canales diferentes de un chip CM5. Los canales del chip CM5 se activaron con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (HNS) según las instrucciones del proveedor. Los anticuerpos 2294, 6G, 2H6 y 2289 se diluyeron cada uno en acetato sódico 10 mM, pH 4.0 y se inyectaron sobre un chip activado a una concentración de 0,005 mg/ml. Cada canal se bloqueó con etanolamina. El péptido A β ₁₋₄₀ (150 μ M) se hizo fluir sobre el chip durante 2 min. A continuación, el anticuerpo 2294 (que se ensaya en una competición de unión) a una concentración de 0,6 μ M se hizo fluir sobre el chip durante 1 min. Se usó tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005 %) como tampón de desarrollo para todos los ensayos de BIAcore. Tras la medida de la unión de A β ₁₋₄₀, todos los canales del chip se regeneraron lavando dos veces con una mezcla de tampón de elución de Pierce (N.º de producto 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y NaCl 4 M (2:1) durante 6 segundos. A continuación, se realizó la unión por competición con el anticuerpo 6G y 2H6 y después con el anticuerpo 2289. Se observó competición entre 2294 y 6G y entre 2294 y 2H6 para la unión a A β ₁₋₄₀, pero no se observó competición entre 2294 y 2289 o entre 6G y 2289. Las observaciones de competición entre el anticuerpo inmovilizado y el mismo anticuerpo tras fluir sobre el chip sirvieron como control positivo. Los datos indican que el anticuerpo 2294 compite con 2H6 y con 6G por la unión a A β ₁₋₄₀.

Ejemplo 4. Afinidad de unión de las regiones Fc del anticuerpo 2294 a los receptores Fc γ murinos.

30 La afinidad de unión de las regiones Fc del anticuerpo a los receptores Fc γ se midió usando un ensayo BIAcore, según se describe anteriormente. Brevemente, los receptores Fc γ murinos purificados (de R&D Systems) se inmovilizaron en un chip CM5 BIAcore mediante reacción química de grupos amino. Se inyectaron diluciones seriadas de anticuerpos monoclonales (oscilando de 2 nM a la concentración máxima como se indica en la Tabla 8). Se utilizó HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005 %) como tampón de desarrollo y de la muestra. Los datos de unión se analizaron usando un modelo de interacción de Langmuir 1:1 para interacciones de elevada afinidad o mediante un

modelo de afinidad en estado de equilibrio para interacción de baja afinidad.

La Tabla 8 a continuación muestra la afinidad de unión del anticuerpo 2294 según se mide mediante la K_D (nM) a $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RI Ib$ y $Fc\gamma RI II I$ murinos. Los anticuerpos deglucosilados tienen una región constante con los residuos de N-glucosilación eliminados. Como se muestra en Tabla 8, el 2294 deglucosilado tiene afinidad reducida para todos los receptores murinos $Fc\gamma$ ensayados según se compara con cada anticuerpo correspondiente sin la N-glucosilación eliminada.

Tabla 8. Afinidad de unión de los anticuerpos a los receptores $Fc\gamma$ murinos medida como K_D (nM)

Anticuerpo	$Fc\gamma RI$	$Fc\gamma RI Ib$	$Fc\gamma RI II I$	Isotipo	Concentración máxima de anticuerpo ensayada en la unión a los receptores $Fc\gamma$ (nM)
2294	1.200	13.000	19.000	IgG2b Murino	18.000
2294 deglucosilado	8.600	NB	NB	IgG2b Murino deglucosilado	22.000
NB: sin unión significativa cuando el anticuerpo se usó a la concentración máxima ensayada.					

Ejemplo 5. Efecto del anticuerpo 2294 y del anticuerpo 2294 deglucosilado en la reducción del depósito de $A\beta$ y en la capacidad cognitiva en el modelo animal de la enfermedad de Alzheimer.

El anticuerpo deglucosilado 2294 se preparó mediante la incubación del anticuerpo purificado 2294 a 37 °C durante 7 días con la péptido-N-glucosidasa F (Prozyme, 0,05 U por mg de anticuerpo) en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. El nivel de deglucosilación se verificó mediante MALDI-TOF-EM y electroforesis en gel de proteínas. Los anticuerpos deglucosilados se purificaron mediante cromatografía de afinidad en Proteína A y la endotoxina se eliminó por Q-Sefarosa. La afinidad de unión a $A\beta_{1-40}$ del 2294 deglucosilado se ensayó usando un ensayo BIAcore descrito anteriormente y se encontró que la afinidad de unión del 2294 deglucosilado a $A\beta_{1-40}$ era idéntica al anticuerpo intacto 2294.

Los efectos del anticuerpo 2294 y del anticuerpo 2294 deglucosilado sobre la inversión de las deficiencias cognitivas, síntomas histológicos y microhemorragia se ensayaron en los ratones transgénicos para APP, Tg2576. La administración del anticuerpo y el análisis histológico y del comportamiento se realizaron como se describe a continuación.

Administración de anticuerpos. En los experimentos se usaron ratones transgénicos que sobreexpresaban la proteína de precursora amiloide mutante "Sueca" (APP Tg2576 con K670N/M671; Hsiao y col., Science 274:99-102 (1996)). El fenotipo similar a Alzheimer presente en estos ratones se ha caracterizado bien. Holcomb y col., Nat. Med. 4:97-100 (1998); Holcomb y col. Behav. Gen. 29:177-185 (1999) y McGowan E., Neurobiol. Dis. 6:231-244 (1999). Para las 16 semanas de tratamiento del estudio, los ratones transgénicos APP, de 20 meses de edad, fueron asignados a uno de los cuatro grupos de tratamiento. El primer grupo recibió semanalmente inyecciones intraperitoneales del anticuerpo anti- $A\beta$ 2294 durante un periodo de 16 semanas (n=4). El segundo grupo recibió semanalmente inyecciones intraperitoneales de anticuerpo anti- $A\beta$ deglucosilado durante un periodo de 16 semanas (n=5). El tercer grupo recibió semanalmente inyecciones intraperitoneales de un anticuerpo anti-AMN (2906; IgG1 anti proteína amnésica de *Drosophila* monoclonal de ratón) durante un periodo de 16 semanas (n=6). Ratones no transgénicos de la misma camada se trataron durante 16 semanas con anticuerpo anti AMN (n=4) o con 2294 (n=2).

Análisis del comportamiento. Tras las 16 semanas de tratamiento con el anticuerpo, los ratones del estudio se sometieron a un modelo de laberinto de agua de pasillos radiales de dos días como se ha descrito previamente. Wilcock y col. J. Neuroinflammation 1:24 (2004). El dispositivo es un laberinto de 6 brazos como han descrito previamente Gordon y col. Neurobiol Aging 22:377-385 (2001). En el día uno, se realizan 15 ensayos en tres bloques de 5. Por cada bloque se estudia secuencialmente una cohorte de 4 ratones (es decir, cada uno de los 4 ratones se somete al ensayo uno, a continuación, el mismo ratón se somete al ensayo dos, etc.). Después de cada bloque de 5 ensayos, se estudia una segunda cohorte de ratones permitiendo un periodo de reposo prolongado antes de exponer a los ratones a un segundo bloque de 5 ensayos. El pasillo objetivo es diferente para cada ratón de una cohorte con el fin de minimizar los restos de olor. El pasillo inicial se variaba en cada ensayo, permaneciendo constante el pasillo inicial ambos días para un individuo determinado. Para los primeros 11 ensayos, la plataforma se mantiene visible de forma alternativa y después se oculta (permaneciendo oculta durante los últimos 4 ensayos). En el segundo día, los ratones corren exactamente de la misma forma que el día uno salvo porque la plataforma permanece oculta durante todos los ensayos. El número de errores (entradas en pasillos incorrectos) se mide durante un

periodo de tiempo de un minuto. A los ratones que son incapaces de elegir un pasillo en 20 segundos se les asigna un error, aunque no se les tuvo que asignar ningún error a los ratones que realizaron este estudio de la forma indicada. Debido a la numeración de los ratones del estudio, los investigadores ignoraban la identidad del grupo de tratamiento de cada ratón. Puesto que las medidas dependientes del cometido en el laberinto de agua de pasillos radiales son cuantitativas, no evaluadoras, se reduce la posibilidad de comprobar el sesgo. Para minimizar la influencia de la de la variabilidad individual del ensayo, se promediaron los errores de cada ratón durante 3 ensayos consecutivos, lo que dio lugar a 5 valores puntuales para cada día que se analizaron estadísticamente mediante ANOVA usando StarView (SAS Institute Inc. NC).

Análisis histológico El día del sacrificio, los ratones se pesaron, se les administró una sobredosis de Nembutal a 100 mg/kg (Abbott Laboratories, Chicago Norte, IL) y a continuación, se perfundieron por vía intracardiaca con 25 ml de cloruro sódico al 0,9 %. Los cerebros se extirparon rápidamente y la mitad izquierda de los mismos se sumergió para su fijación durante 24 h en paraformaldehído al 4 % recién preparado en KPO₄ 100 mM (pH 7,2) para su análisis histológico. A continuación, las mitades de los cerebros se incuban durante 24 h secuencialmente en sacarosa al 10 %, al 20 % y al 30 % para crioprotección. Se recogen secciones horizontales de 25 μ usando un microtomo de corte y se conservan a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con azida sódica (pH 7,2) para prevenir el crecimiento microbiano. Se selecciona al azar una serie de 8 secciones de tejido espaciadas de forma equivalente a una distancia de 600 μ que abarcan el cerebro completo y se tiñen usando inmunohistoquímica por flotación para el A β total (anticuerpo policlonal de conejo anti-pan A β ; Biosource, Camarillo, CA, dilución 1:10.000) como se ha descrito previamente. Gordon y col., Exp. Neurol. 173:153-195 (2002); Wilcock y col. J. Neurosci. 24:6144-6151 (2004). Una segunda serie de secciones de tejido con 600 μ m de separación se tiñó usando rojo Congo al 0,2 % en etanol al 80 % saturado con NaCl. También se montó otro conjunto de secciones que se tiñó para hemosiderina usando ferrocianuro potásico al 2 % en ácido clorhídrico al 2 % durante 15 min, seguido de una contratinción en una solución de rojo neutro al 1 % durante 10 min. La cuantificación de la tinción con rojo Congo y la inmunohistoquímica de A β se realizó usando el Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) para analizar el área porcentual ocupada por la tinción positiva. Se analizan una región de la corteza frontal y tres regiones del hipocampo (para asegurarse de que no hay un sesgo regional en los valores del hipocampo). El análisis inicial del rojo Congo se realiza para proporcionar un valor total. Se realiza un segundo análisis tras la edición manual de todos los depósitos amiloides parenquimales para obtener un porcentaje de área restringida para la tinción con rojo Congo vascular. Para estimar el área parenquimal de rojo Congo, se sustrajeron los valores amiloides vasculares del porcentaje total. Para la tinción con hemosiderina, se contaron todos los valores de sitios positivos para el azul de Prusia en todas las secciones y se calculó el valor medio de número de sitios por sección. A un menor aumento se observaron en las secciones diferencias cualitativas entre animales. Se examinan 8 secciones a espacios iguales, se determina el número de perfiles positivos y se promedia un valor por sección. Para evaluar posibles diferencias relacionadas con el tratamiento, los valores para cada grupo de tratamiento se analizaron mediante una ANOVA de una vía seguido de las comparaciones de medias LSD de Fisher.

Medida del nivel en suero del péptido A β usando ELISA El suero recogido un día después de la última dosis de anticuerpos se diluye y se incuba en placas de microvaloración de 96 pocillos (MaxiSorp; Nunc, Roskilde, Dinamarca), que se cubrieron previamente con anticuerpo 6E10 (anticuerpo anti-beta amiloide que se une a A β ₁₋₁₇; Signet, Dedham, MA) a 5 μ g/ml en tampón PBS a pH 7,4. El anticuerpo secundario es 4G8 biotinilado (anticuerpo anti-beta amiloide que se une a A β ₁₇₋₂₄; Signet) a una dilución 1:5.000. La detección se realiza usando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences), seguido de la adición del sustrato TMB (KPL, Gaithersburg, MD). Para las curvas patrón se usa un aumento de dosis de A β ₁₋₄₀ (American Peptide) de 6 a 400 pM.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritas en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos serán sugeridos por los expertos en la técnica y están incluidos en el espíritu y alcance de esta solicitud. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en el presente documento se incorporan por la presente por referencia en su totalidad para todos los fines en el mismo grado que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual estuviera específica e individualmente indicada por referencia.

Depósito de materiales biológicos

Los materiales siguientes se han depositado en la *American Type Culture Collection*, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Material	N.º del anticuerpo	N.º de acceso de la ATCC	Fecha de depósito
pDb.6G hFc2a	Cadena pesada de 6G	PTA-6786	15 de junio, 2005

pEb.6G.hK

Cadena ligera de 6G PTA-6787

15 de junio, 2005

El vector pEb.6G.hK es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena ligera de 6G y la región constante de la cadena ligera kappa y el vector pDb.6G.hFc2a es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena pesada de 6G y la región constante de la cadena pesada de IgG2a que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (la numeración de los aminoácidos está basada en la numeración de Kabat con referencia a la secuencia de la IgG2a de tipo silvestre, véase Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624)

Estos depósitos se hicieron según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes y sujeto a las Regulaciones de este (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. El depósito se hará disponible por la ATCC según los términos del Tratado de Budapest y sujeto a un acuerdo entre Rinat Neuroscience Corp. y la ATCC que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo del depósito al público tras la emisión de la patente de EE.UU. pertinente o tras su exposición al público de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, lo que ocurra primero y asegura la disponibilidad de la progenie a quien determine el Comisario de Patentes y Marcas de EE.UU. que tiene derecho a ello según el título 35 del USC § 122 y las normas del Comisario (incluyendo el título 37 del CFR § 1.14, con referencia particular a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha aceptado que si un cultivo de los materiales depositados muriera o se perdiera o destruyera durante el cultivo en condiciones adecuadas, los materiales serían sustituidos con notificación lo antes posible por otros similares. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como un permiso para poner en práctica la invención con vulneración de los derechos garantizados por la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con esta legislación sobre patentes.

Secuencias del anticuerpo:

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 6G (ID SEC N° 1):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAIHWVRQ
APGQGLEWMGFTSPYSGVSNYNQKFKGRVTMTRDTSTST
VYMESSLRSEDTAVYYCARFDNYDRGYVRDYWGQGLTV
TVS

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 6G (ID SEC N° 2)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNDRISFLNW
YQQKPGQPPKLLIYAATKQGTGVPDRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQAEDVAVYYCQQSKEFPWSFGGGTKVEIKRTV

CDR H1 de 6G (CDR prolongada) (ID SEC N° 3)

GYTFTTYAIH

CDR H2 de 6G (CDR prolongada) (ID SEC N° 4)

FTSPYSGVSNYNQKFKG

CDR H3 de 6G (CDR prolongada) (ID SEC N° 5)

FDNYDRGYVRDY

CDR L1 de 6G (CDR prolongada) (ID SEC N° 6)

RASESVDNDRISFLN

CDR L2 de 6G (CDR prolongada) (ID SEC N° 7)

AATKQGT

CDR L3 de 6G (CDR prolongada) (ID SEC N° 8)

QQSKEFPWS

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 6G (ID SEC N° 9)

CAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGTGCCGAGGTGAAAAAGCCAGGCGCCTCCGTGA
AAGTGTCTCTGCAAAGCCTCCGGTTACACCTTTACCACCTATGCCATCCATTGGGTG
CGCCAGGCCCCAGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTTTACTTCCCCCTACTCCG
GGGTGTCGAATTACAATCAGAAGTTCAAAGGCCGCGTCACCATGACCCGCGACAC
CTCCACCTCCACAGTGTATATGGAGCTGTCCTCTCTGCGCTCCGAAGACACCGCCG
TGTATTACTGTGCCCCGCTTCGACAATTACGATCGCGGCTATGTGCGTGACTATTGG
GGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCC

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 6G (ID SEC N° 10)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCCGTGTCCTGGGCGAGCGCG
CCACCATCAACTGCCGCGCCAGCGAATCCGTGGATAACGATCGTATTTCTTTCT
GAACTGGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCCGC
CACCAAACAGGGTACCGGCGTGCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGTTCCGGCAC
CGATTTCACTCTGACCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAAGATGTGGCAGTGTATTAC
TGTCAGCAGTCCAAAGAGTTTCCCTGGTCCTTTGGCGGTGGCACCAAGGTGGAGA
TCAAACGCACTGTG

5

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo completo 6G (incluyendo la IgG2a modificada como se describe en el presente documento) (ID SEC N° 11)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTYAIHWVRQAPGQGLEWMGFTSPYSG
VSNYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARFDNYDRGYVRDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVE
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPML
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo completo de 6G (ID SEC N° 12)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVDNDRISFLNWFYQQKPGQPPKLLIYAATK
QGTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEFPWSFGGGTKVEIKRTV
AAPSIVFIPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo completo de 6G (incluyendo la IgG2a modificada como se describe en este documento) (ID SEC N° 13)

CAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGTGCCGAGGTGAAAAAGCCAGGCGCCTCCGTG
 AAAGTGTCTGCAAAGCCTCCGGTTACACCTTTACCACCTATGCCATCCATTGGGT
 GCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTTTACTTCCCCCTACTCC
 GGGGTGTCGAATTACAATCAGAAGTTCAAAGGCCGCGTCACCATGACCCGCGAC
 ACCTCCACCTCCACAGTGTATATGGAGCTGTCCTCTCTGCGCTCCGAAGACACCG
 CCGTGTATTACTGTGCCCGCTTCGACAATTACGATCGCGGCTATGTGCGTGACTION
 TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCTG
 TCTTCCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGG

CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGC
 GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGACAGTCTCAGGTCTCTA
 CTCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTAC
 ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAG
 AGAAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCAT
 CCGTGTCTCTGTTCCCTCCAAAGCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCAGAACCCC
 AGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTC
 AACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAG
 GAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGG
 ACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCAT
 CCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGG
 TGTATACCCTGCCCCATCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
 CTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAAC
 GGACAGCCAGAGAACAATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGA
 TCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAA
 ACGTGTCTCTTGTTCGGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATAACCAGAA
 GAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAG

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo completo de 6G (ID SEC N° 14)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGAGCGCG
 CCACCATCAACTGCCGCGCCAGCGAATCCGTGGATAACGATCGTATTTCTTTCTG
 AACTGGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCCGCCA
 CCAAACAGGGTACCGGCGTGCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGTTCCGGCACCGA
 TTTACTCTGACCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAAGATGTGGCAGTGTATTACTGTC
 AGCAGTCCAAAGAGTTTCCCTGGTCCTTTGGCGGTGGCACCAAGGTGGAGATCAA
 ACGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGA
 AATCCGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCC
 AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCAGGAGAGT
 GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACC
 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCAT
 CAGGGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGC

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un péptido A β , que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las tres CDR mostradas en las ID SEC N° 3, ID SEC N° 4 e ID SEC N° 5 y una región variable de la cadena ligera que comprende las tres CDR mostradas en las ID SEC N° 6, ID SEC N° 7 e ID SEC N° 8.
- 2.El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.
- 3.El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 2.
- 10 4.El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en la ID SEC N° 11 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en la ID SEC N° 12.
- 5.El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une a A β ₁₋₄₀ con al menos aproximadamente 40 veces más afinidad que su unión a A β ₁₋₄₂ o a A β ₁₋₄₃.
- 15 6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el fragmento Fab del anticuerpo se une a A β ₁₋₄₀ con una afinidad de aproximadamente 10 nM o menor.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que el fragmento Fab del anticuerpo se une a A β ₁₋₄₀ con una afinidad de aproximadamente 5 nM o menor.
- 20 8.El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el isotipo del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 9.El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una región Fc, en el que la región constante de la cadena pesada tiene una función efectora alterada.
- 10.El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que se elimina la N-glucosilación de la región Fc.
- 25 11.El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es una región constante de la IgG2a humana que comprende las mutaciones de los aminoácidos A330P331 a S330S331, en el que la posición de los aminoácidos se basa en la numeración de Kabat en referencia a la secuencia de la IgG2a humana de tipo silvestre.
- 30 12.El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es una región constante de la IgG4 humana que comprende las mutaciones de los aminoácidos E233F234L235 a P233V234A235, en el que la posición de los aminoácidos se basa en la numeración de Kabat en referencia a la secuencia de la IgG4 humana de tipo silvestre.
13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 35 14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el anticuerpo un anticuerpo humanizado.
- 15.Un fragmento de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho fragmento tiene o mantiene la especificidad de unión de dicho anticuerpo monoclonal.
- 16.El fragmento de la reivindicación 15, en el que el fragmento es un Fab, un Fab', un F(ab')₂ o un Fv.
- 40 17.Un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 18.Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 17.
- 19.El vector de la reivindicación 18, en el que dicho vector es pDb.6G.hFc2a con número de depósito de la ATCC N.º PTA-6786 o en el que dicho vector es pEb.6G.hK con número de depósito de la ATCC N.º PTA-6787.
- 45 20.Una célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 17.
- 21.Un procedimiento de producción de un anticuerpo, que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 20 que contiene el polinucleótido de la reivindicación 17 en condiciones tales que el anticuerpo es producido y aislar el anticuerpo de la célula huésped o del cultivo.

- 22.Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o de un fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 23.Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 22 para la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar, inhibir o retrasar el desarrollo de una enfermedad asociada con la expresión alterada de A β o de β aPP o con la acumulación de péptido A β .
- 24.Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o un fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16 para su uso en prevenir, tratar, inhibir o retrasar el desarrollo de una enfermedad asociada con la expresión alterada de A β o de β aPP o con la acumulación de péptido A β .
- 10 25.El uso de la reivindicación 23 o el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 24 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o para retrasar el desarrollo de un síntoma asociado con la enfermedad de Alzheimer en un sujeto.
- 26.El uso de la reivindicación 23 o el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 24, en el que la enfermedad es la demencia multi-infarto, el deterioro cognitivo leve, la angiopatía amiloide cerebral, el síndrome de Down, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la demencia con cuerpos de Lewy, o el SIDA.
- 15 27.Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 22 para la fabricación de un medicamento para la supresión de formación de o reducción de placas amiloides en un sujeto.
- 28.Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 22 para la fabricación de un medicamento para mejorar la capacidad cognitiva o invertir el declive cognitivo asociado con depósito amiloide de A β en un sujeto.
- 20

Figura 1

Negrita: CDR de Kabat

Subrayado: CDR de Chothia

Dominio variable de cadena pesada 6G

1 5 10 15 20 25 30 35 H1
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAIHWVRQ

40 45 50 55 60 65 70 75 H2
 APGQGLEWMGFTSPYSGVSNYNQKFKGRVTMTRDTSTST

80 85 90 95 100 105 110 115 H3
 VYMEISSLRSEDTAVYYCARFDNYDRGYVRDYWGQGLTV

120
 TVS

Dominio variable de cadena ligera 6G

1 5 10 15 20 25 30 35 L1
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNDRISFLNW

40 45 50 55 60 65 70 75 L2
 YQQKPGQPPKLLIYAATKQGTGVPDRFSGSGSGTDFTLT

80 85 90 95 100 105 110 114 L3
 ISSLQAEDVAVYYCQQSKEFPWSFGGGTKVEIKRTV

Figura 2

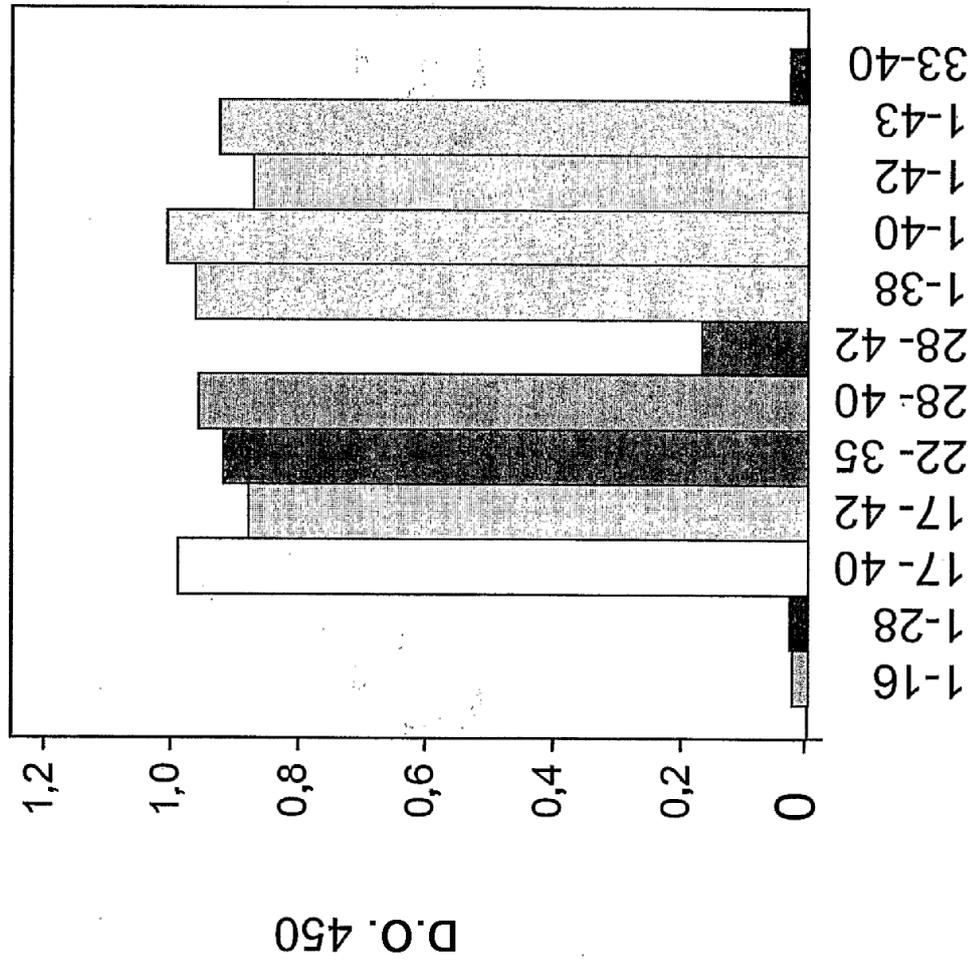


Figura 3

Mapeo de epítomos de anticuerpo 6G por exploración de péptidos por ELISA

<u>Péptidos 15-meros</u>	<u>ELISA A450</u>
FFAEDVGSNKGAIIGG	NB
FAEDVGSNKGAIIGLG	>3
AEDVGSNKGAIIGLMG	>3
EDVGSNKGAIIGLMVG	>3
DVGSNKGAIIGLMVGG	2,3
VGSNKGAIIGLMVGGG	2,1
GSNKGAIIGLMVGGVG	1,5
SNKGAIIGLMVGGVWG	NB
NKGAIIGLMVGGVWIG	NB

<u>Péptidos 10-meros</u> (epítomo mínimo puesto a prueba)	
VGSNKGAIIGG	NB
GSNKGAIIGLG	2
SNKGAIIGLMG	NB

Figura 4

Representación esquemática de epítipo de anticuerpo 6G

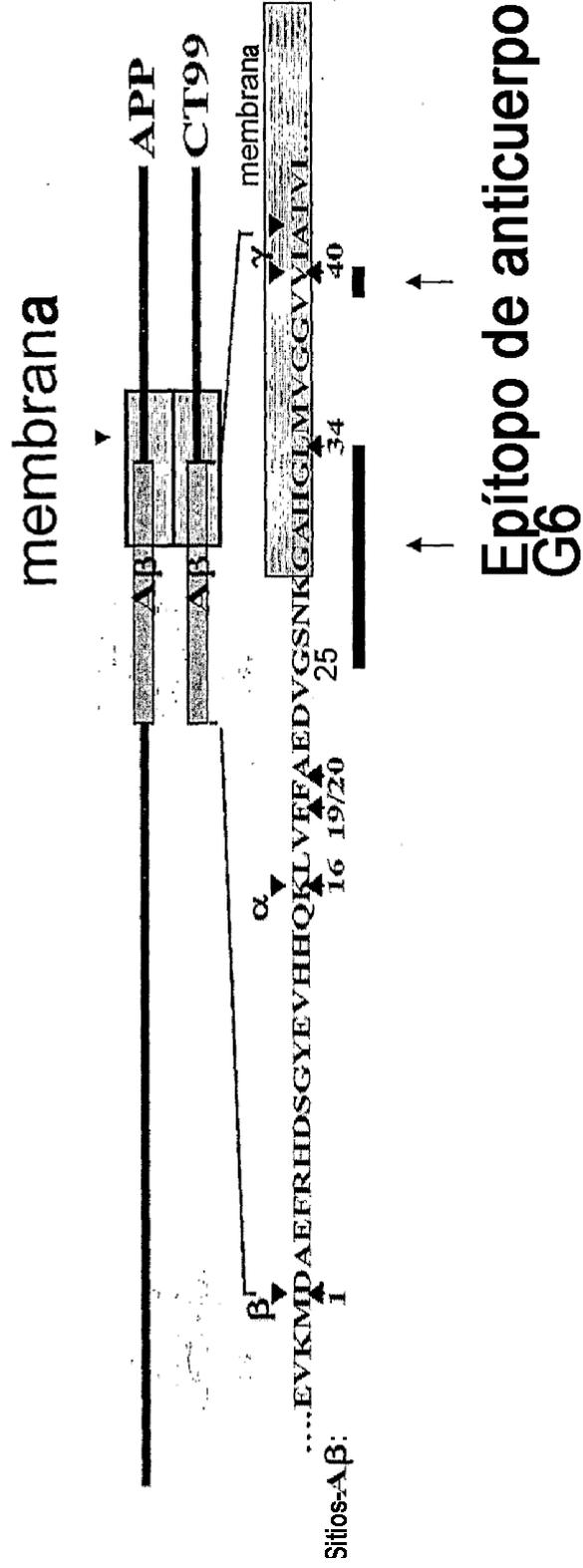
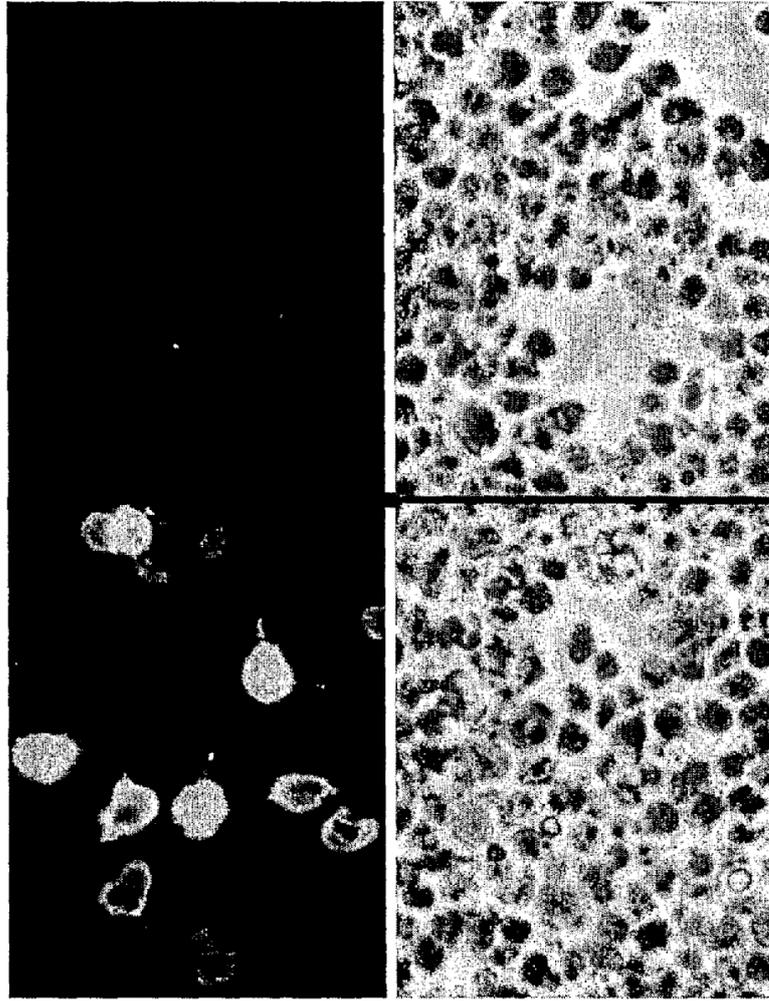


Figura 5

m2324
(1-16)

6G



Transfectar: APP humana

Mapeo de epítomos:		2294	6G
PÉPTIDO 15-MERO			
19	FFAEDVGSNKGAIIGG	NB	NB
20	FAEDVGSNKGAIIGLG	>3	>3
21	AEDVGSNKGAIIGLMG	2.9	>3
22	EDVGSNKGAIIGLMVG	>3	>3
23	DVGSNKGAIIGLMVGG	>3	2.3
24	VGSNKGAIIGLMVGGG	>3	2.1
25	GSNKGAIIGLMVGGVG	>3	1.5
26	SNKGAIIGLMVGGVVG	>3	NB.
27	NKGAIIGLMVGGVVIG	NB	NB
28	KGAIIGLMVGGVVIAG	NB	NB
DATOS DE UNIÓN DE PÉPTIDOS 10-MEROS: EPÍTOPO MÍNIMO PUESTO A PRUEBA			
	VGSNKGAIIGG	2294	6G
	GSNKGAIIGLG	NB	NB
	SNKGAIIGLMG	2	>3
		NB	NB

Figura 6