

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 086**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2011 PCT/US2011/059964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064836**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2011 E 11785551 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2638070**

54 Título: **Métodos y composiciones para la inmunoterapia de enfermedades neuronales**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061426425 P

01.12.2010 US 418850 P

30.11.2010 US 418310 P

10.11.2010 US 456642 P

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

29.03.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

ATWAL, JASVINDER;

CHEN, YONGMEI;

CHIU, CECILIA PUI CHI;

LAZARUS, ROBERT A.;

WANG, WEIRU;

WATTS, RYAN J.;

WU, YAN y

ZHANG, YINGNAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 607 086 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

Métodos y composiciones para la inmunoterapia de enfermedades neuronales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a anticuerpos que son antagonistas de BACE1 que, por ejemplo, inhiben o reducen la actividad de BACE1 y a composiciones que comprenden dichos anticuerpos. Otras realizaciones adicionales incluyen métodos de tratamiento y de diagnóstico de diversas enfermedades o trastornos
10 neurológicos, así como métodos de reducción de los polipéptidos APP y/o A β en un paciente.

Antecedentes

La amiloidosis no es una sola entidad patológica, sino más bien un grupo diverso de procesos patológicos
15 progresivos que se caracterizan por depósitos en tejido extracelular de una proteína de tipo almidón, c \acute{e} rea, denominada amiloide, que se acumula en uno o m \acute{a} s \acute{o} rganos o sistemas del organismo. A medida que los depósitos de amiloide se acumulan, empiezan a interferir en la funci3n normal del \acute{o} rgano o sistema del organismo. Existen al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son la amiloidosis primaria sin antecedente conocido, la amiloidosis secundaria a alguna otra afecci3n y la amiloidosis hereditaria.

Muchas enfermedades del envejecimiento se basan en o est \acute{a} n asociadas con prote3nas de tipo amiloide, y se caracterizan, en parte, por la acumulaci3n de dep3sitos extracelulares de amiloide o material de tipo amiloide que contribuyen a la patog \acute{e} nesis, as3 como a la progresi3n de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitaci3n, trastornos neurol3gicos tales como enfermedad de Alzheimer (EA), demencia de cuerpos de Lewy, s3ndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holand \acute{e} s); el complejo de Parkinson-demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan en o est \acute{a} n asociadas con las prote3nas de tipo amiloide son la par \acute{a} lisis supranuclear progresiva, esclerosis m3ltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotr3fica), diabetes de adulto, amiloidosis cardiaca senil, tumores endocrinos y otros, incluyendo la degeneraci3n macular.
20

Es probable que el polip \acute{e} ptido amiloide- β (A β) desempe \acute{n} e un papel central en la patog \acute{e} nesis de la enfermedad de Alzheimer (EA). Vassar *et al.*, *J. Neurosci.* 29:12787-12794 (2009). La acumulaci3n del polip \acute{e} ptido A β en el SNC da como resultado la disfunci3n sin \acute{a} ptica, la degeneraci3n axonal y la muerte neuronal. Los cerebros de los pacientes con EA muestran una patolog3a caracter3stica de lesiones neuropatol3gicas prominentes, tales como mara \acute{n} as neurofibrilares (NFT) y placas seniles ricas en amiloides. El componente principal de las placas amiloides es A β . Estas lesiones se asocian con la p \acute{e} rdua masiva de poblaciones de neuronas del sistema nervioso central (SNC), y su progresi3n acompa \acute{n} a la demencia cl3nica asociada con la EA.
25

A β es el producto proteol3tico de la prote3na precursora, la prote3na precursora amiloide-beta (β -APP o APP). APP es una prote3na transmembrana de tipo I que es escindida secuencialmente por dos proteasas, una β -secretasa y una γ -secretasa. La β -secretasa, conocida como la enzima 1 de escisi3n de la prote3na precursora amiloide en el sitio β (BACE1), primero escinde la APP para dejar al descubierto el extremo N-terminal de A β , produciendo de este modo un fragmento unido a la membrana conocido como C99. Vassar *et al.*, *J. Neurosci.*, 29:12787-12794 (2009) y entrada P56817 de UniProtKB/Swiss-Prot (BACE1_HUMANA). La γ -secretasa es, pues, capaz de escindir C99 para producir el polip \acute{e} ptido A β maduro. A β se produce con extremos C heterog \acute{e} neos, cuya longitud var3a de 38 amino \acute{a} cidos a 43 amino \acute{a} cidos. La forma de 42 amino \acute{a} cidos de A β (A β 42) es la forma de fibrilog \acute{e} nica A β , y se sobreexpresa en los pacientes con s3ndrome de Down, y se ha sugerido que desempe \acute{n} a un papel en la patog \acute{e} nesis temprana d la EA. Vassar *et al.*, *J. Neurosci.* 29:12787-12794 (2009). Por lo tanto BACE1 se ha convertido en una diana terap \acute{e} utica, pues su inhibici3n inhibe presumiblemente la producci3n de APP y A β .
30

De hecho, los ratones con desactivaci3n de BACE1 (BACE1 $^{-/-}$) no producen A β cerebral, lo que confirma que BACE1 es la principal, si no la \acute{u} nica, enzima responsable de la producci3n A β en el cerebro. Roberds *et al.*, *Human Mol. Genetics* 10:1317-1324 (2001). Por otra parte, los ratones con desactivaci3n de BACE1 en modelos de EA no forman placas amiloides; tambi \acute{e} n se rescatan los defectos cognitivos y la disfunci3n colin \acute{e} rgica. McConlogue *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282: 26326-26334 (2007); Ohno *et al.*, *Neuron* 41: 27-33 (2004); y Laird *et al.*, *J. Neurosci.* 25:11693-11709 (2005). Adem \acute{a} s, los ratones heterocigotos con desactivaci3n de BACE1 tienen una formaci3n reducida de placa, lo que indica que la inhibici3n completa de la actividad de BACE1 no es necesaria para la reducci3n de la placa. McConlogue *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282: 26326-26334 (2007).
35

Recientemente, la APP ha demostrado ser un ligando para el receptor de la muerte 6 (DR6), que desencadena la muerte de los cuerpos celulares neuronales dependiente de la caspasa y el recorte axonal. Nikolaev *et al.*, *Nature* 457: 981-989 (2009). Adem \acute{a} s, un compuesto inhibidor de BACE1 afecta a la degeneraci3n de los axones y los cuerpos celulares. *Id.* Estos resultados apuntan a un modelo en el que la APP, a trav \acute{e} s de la uni3n a DR6, puede contribuir a la EA.
40

65

Sería beneficioso tener un inhibidor terapéutico eficaz de BACE1 para reducir la producción de APP y A β en pacientes con enfermedades y trastornos neurológicos, tales como la EA. La invención proporcionada en el presente documento se refiere a dichos inhibidores, incluyendo su uso en una variedad de métodos.

5 Los documentos WO 2009/121948 y WO 2009/155609 desvelan anticuerpos dirigidos al ectodominio de BACE1 y a un uso de los mismos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Sumario

10 La invención proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento del mismo, que se une a BACE1 y reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 según lo definido en las reivindicaciones anexas.

15 En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una secuencia de HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 25.

20 En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 correspondientes a las expuestas para los clones YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 y YW412.8.51 en la Figura 1(B).

25 En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE y comprende una secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO: 22 o 23, una secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO: 24 y una secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO: 25. En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO: 23, una secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO: 24 y una secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO: 25.

30 En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) variable de SEQ ID NO: 21.

35 En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende las secuencias de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 correspondientes a las expuestas para los clones YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 y YW412.8.51 en la Figura 1(A).

40 En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; una secuencia de HVR-L2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y una secuencia de HVR-L3 seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 11-16. En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO: 7, una secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO: 9 y una secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO: 12.

45 En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO: 9-10.

50 En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO: 11-16.

55 En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (VL) variable que es SEQ ID NO: 2.

60 En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO: 23, una secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO: 24, una secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO: 25, una secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO: 7, una secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO: 9 y una secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO: 12.

65 En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, en la que el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1 y comprende una cadena VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo aislado que se une a un epítipo que comprende al menos uno de los restos de aminoácido de BACE1 seleccionado del grupo que consiste en: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS;

327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEQ ID NO: 49. En ciertos aspectos de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo de BACE1, que comprende los aminoácidos: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEQ ID NO: 49.

5 En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo de BACE1 que comprende al menos una región de aminoácidos de BACE1 seleccionada del grupo que consiste en: los aminoácidos 315-318 de SEQ ID NO: 49; los aminoácidos 331-335 de SEQ ID NO: 49; los aminoácidos 370-381 de SEQ ID NO: 49; y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo de BACE1 que comprende los aminoácidos 315-318, 331-335 y 370-381 de SEQ ID NO: 49.

10 En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo de BACE1, dando lugar a un cambio en la configuración de la estructura de los sitios P6 y P7 de BACE1 tras la unión. En un aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo de BACE1, lo que induce a los aminoácidos 218-231 de SEQ ID NO: 49 a adoptar una estructura de bucle aleatorio.

15 Un anticuerpo de la invención puede estar en cualquiera de una serie de formas. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En otros aspectos, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento que comprende un componente de unión al antígeno). En otros aspectos de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto, un anticuerpo de la invención se puede enlazar o conjugar a un agente o una fracción, por ejemplo, un agente citotóxico, para crear un inmunocombinado.

20 En una realización, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En realizaciones adicionales, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención, así como un vector que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. En otro aspecto, se proporciona una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención, así como métodos de producción de un anticuerpo de la invención que comprenden cultivar la célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención en condiciones adecuadas para la producción del anticuerpo.

25 También se desvela un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención.

30 También se desvela un método de reducción de las placas amiloides, o de inhibición de la formación de placas amiloides, en un paciente que padece, o está en riesgo de contraer, una enfermedad o un trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención.

35 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método de reducción de la proteína A β en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. En un aspecto, el paciente padece, o está en riesgo de contraer una enfermedad o un trastorno neurológico.

40 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de inhibición de la degeneración axonal en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención.

45 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un método de diagnóstico de una enfermedad o un trastorno neurológico en un paciente que comprende poner en contacto una muestra biológica aislada del paciente con un anticuerpo de la invención en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo a un polipéptido BACE1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido BACE1.

50 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un método de determinación de si un paciente es idóneo para la terapia con un anticuerpo anti-BACE1, que comprende poner en contacto una muestra biológica aislada del paciente con un anticuerpo de la invención en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo a un polipéptido BACE1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido BACE1, en el que la presencia de un complejo entre el anticuerpo y BACE1 es indicativo de que el paciente es idóneo para la terapia con un anticuerpo anti-BACE1. En un aspecto, el paciente padece o está en riesgo de contraer una enfermedad o un trastorno neurológico.

55 En un aspecto, las muestras biológicas que se pueden usar en el diagnóstico de una enfermedad o afección neurológica; o para predecir la capacidad de respuesta o determinar la idoneidad de un paciente para un tratamiento con un anticuerpo BACE1 incluyen, pero sin limitación, fluidos tales como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucus, fluido cefalorraquídeo, fluido linfático y similares, o muestras de tejido o de células obtenidas de un organismo tal como tejido neuronal, cerebral, cardíaco o vascular.

60 En un aspecto de los métodos de la divulgación, el paciente es mamífero. En otro aspecto, el paciente es un ser humano. En otro aspecto, la enfermedad o el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), lesión cerebral traumática, apoplejía, glaucoma, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de

Liddle, enfermedad de Paget, lesión cerebral traumática, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome de postpoliomielitis, síndrome de Shy-Draeger, atrofia olivopontocerebelar, enfermedad de Parkinson, atrofia sistémica múltiple, degeneración estriatonigral, parálisis supranuclear, encefalopatía espongiiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, caquexia crónica, insomnio familiar fatal, parálisis bulbar, enfermedad de las neuronas motoras, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis ceroides neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del cabello ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden-Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Unverricht-Lundborg, demencia (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Pick y ataxia espinocerebelosa). En un aspecto, la enfermedad o el trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un epítipo de BACE1 que es reconocido específicamente por un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende al menos uno de los restos de aminoácidos de BACE1 que corresponden a los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRY; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEQ ID NO: 49. En un aspecto, el epítipo de BACE1 comprende los aminoácidos que corresponden a 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRY; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEQ ID NO: 49.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un epítipo de BACE1 que es reconocido específicamente por un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende al menos una región de aminoácidos de BACE1 seleccionada del grupo que consiste en: los aminoácidos 315-318 de SEQ ID NO: 49; los aminoácidos 331-335 de SEQ ID NO: 49; los aminoácidos 370-381 de SEQ ID NO: 49; y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el epítipo de BACE1 comprende los aminoácidos 315-318, 331-335 y 370-381 de SEQ ID NO: 49.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1B representan las secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras y pesadas del clon YW412.8 obtenido de un tipo no tratado previamente de la biblioteca de presentación en fagos de diversidad natural y formas de afinidad madurada de YW412.8 según lo descrito en el Ejemplo 1(A). La Figura 1A representa las alineaciones de las secuencias de la cadena ligera. La Figura 1B representa las alineaciones de las secuencias de la cadena pesada. En ambas Figuras 1A y 1B, las secuencias de HVR para cada clon se indican mediante las regiones de los recuadros, indicando el primer recuadro HVR-L1 (SEQ ID NO: 7 y 8 - Figura 1A) o HVR-H1 (SEQ ID NO: 22 y 23 - Figura 1B), indicando el segundo recuadro HVR-L2 (SEQ ID NO: 9 y 10 - Figura 1A) o HVR-H2 (SEQ ID NO: 24 - Figura 1B) e indicando el tercer recuadro HVR L3 (SEQ ID NO: 11 a 16 - Figura 1A) o HVR-H3 (SEQ ID NO: 25 - Figura 1B).

Las Figuras 1A-1B representan las secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras y pesadas del clon Fab 12 obtenido de un tipo no tratado previamente de la biblioteca de presentación en fagos de diversidad natural y formas de afinidad madurada de Fab 12 según lo descrito en el Ejemplo 1(B). La Figura 2A representa las alineaciones de las secuencias de la cadena ligera. La Figura 2B representa las alineaciones de las secuencias de la cadena pesada. En ambas Figuras 2A y 2B, las secuencias de HVR para cada clon se indican mediante las regiones de los recuadros, indicando el primer recuadro HVR-L1 (SEQ ID NO: 35 - Figura 2A) o HVR-H1 (SEQ ID NO: 28 - Figura 2B), indicando el segundo recuadro HVR-L2 (SEQ ID NO: 36-39 - Figura 2A) o HVR-H2 (SEQ ID NO: 29 - Figura 2B) e indicando el tercer recuadro HVR L3 (SEQ ID NO: 40 - Figura 2A) o HVR-H3 (SEQ ID NO: 30 - Figura 2B).

Las Figuras 3A y 3B representan las secuencias de HVR o de CDR de los Fab de cadena ligera y pesada aislados a partir de la biblioteca de presentación en fagos de diversidad sintética según lo descrito en el Ejemplo 1(B). La numeración es de acuerdo a la nomenclatura de Kabat *et al.* La Figura 3A desvela las secuencias de "CDRL1" como SEQ ID NO: 133, las secuencias de "CDRL2" como SEQ ID NO: 134, las secuencias de "CDRL3" como SEQ ID NO: 135-144, 141 y 145-152 y las secuencias de "CDRH1" como SEQ ID NO: 153-159, 158, 160-161, 159, 158, 162, 161 y 163 a 167 todas, respectivamente, por orden de aparición.

La Figura 3B desvela las secuencias de "CDRH2" como SEQ ID NO: 168-177, 174, 171, 178-182, 177 y 183, y las secuencias de "CDRH3" como SEQ ID NO: 184-202, todas, respectivamente, por orden de aparición.

La Figura 4 proporciona una gráfica que muestra la inhibición de BACE1 por los diferentes clones identificados de las bibliotecas de presentación en fagos de diversidad natural y de diversidad sintética. Los clones se ensayaron para determinar la inhibición de BACE1 en un ensayo homogéneo de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF), como se describe en el Ejemplo 1(A). Todos los anticuerpos de la serie YW se usaron a una concentración de 500 nM, a excepción del anticuerpo YW 434,6, que se ensayó a una concentración de 320 nM. Los anticuerpos 12.IgG, 14.IgG LC6.IgG, LC9.IgG, LC10.IgG y LC11.IgG se ensayaron a concentración 1 µM.

La Figura 5 es una gráfica que muestra la actividad de BACE1 en un ensayo de HTRF en presencia de Fab anti-BACE1 identificados de la biblioteca de presentación en fagos de diversidad sintética, como se describe en el Ejemplo 1(B). Las líneas corresponden al 100 % de actividad (0 % de inhibición) en presencia de BACE1 y sustrato (Control de PBS) y el 100 % de inhibición en ausencia de BACE1.

La Figura 6 representa las secuencias de CDR o HVR de Fab anti-BACE1 de afinidad madurada como se describe en el Ejemplo 1(B). La numeración es de acuerdo a la nomenclatura de Kabat *et al.* La relación de ELISA de competencia es la relación de la señal de ELISA en ausencia o en presencia de BACE1 20 nM como competidor en solución en ensayos de ELISA de competición de un punto, como se describe en el Ejemplo 1(B).

La Figura 6 desvela las secuencias de "CDRL1" como SEQ ID NO: 133, 133, 133, 133, 133 y 203, las secuencias de "CDRL2" como SEQ ID NO: 134, 134 y 204-207, las secuencias de "CDRL3" como SEQ ID NO: 208-209, 145, 145 y 145-146, las secuencias de "CDRH1" como SEQ ID NO: 157, 157, 158, 158, 158 y 162, las secuencias de "CDRH2" como SEQ ID NO: 172, 172, 171, 171, 171 y 178; y las secuencias de "CDRH3" como SEQ ID NO: 188, 188, 195, 195 y 195-196, todas, respectivamente, por orden de aparición.

Las Figuras 7A-7C contienen gráficas que muestran los datos de los ensayos ELISA competitivos con clones anti-BACE de afinidad madurada como se describe en el Ejemplo 1(B). La unión entre fago de presentación de Fab y BACE 1 inmovilizado en placas se compitió con dilución en serie de BACE1 en solución. Las Figuras 7A, 7B y 7C representan las curvas de competición para los anticuerpos parentales y los anticuerpos de afinidad madurada correspondientes.

Las Figuras 8A-8C representan gráficas que muestran la inhibición de BACE1 con Fab anti-BACE1 en un ensayo enzimático HTRF como se describe en el Ejemplo 1(B). Se midió la actividad de inhibición de los Fab purificados para clones anti-BACE1 individuales en un ensayo enzimático HTRF. OM99-2 (CalBiochem®, n.º de catálogo 496000), es un inhibidor de péptido sintético para BACE1, y se usó como control positivo. Las Figuras 8A, 8B y 8C son curvas de inhibición para el parental y los derivados de afinidad madurada correspondientes. La IC_{50} para OM99-2 fue de 1 nM en este ensayo.

La Figura 9A proporciona una gráfica que muestra el impacto del anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 de afinidad madurada sobre la actividad enzimática *in vitro* de BACE1 humano recombinante usando bien un sustrato de péptido largo con una mayor susceptibilidad a BACE1 en un ensayo HTRF (panel izquierdo) o un sustrato de péptido corto con una mayor susceptibilidad a BACE1 en un ensayo de FRET (panel derecho), como se describe en el Ejemplo 2(B). Se usaron OM99-2 (CalBiochem®, n.º de catálogo 496000), un inhibidor de péptido sintético de BACE1, inhibidor de β -secretasa IV (CalBiochem®, n.º de catálogo 565788), un inhibidor de molécula pequeña de BACE1 (BACE1 SMI) y un anticuerpo IgG que no se une a BACE1 como controles. Las Figuras 9B-1 y 9B-2 también proporcionan gráficas que muestran la actividad enzimática *in vitro* del dominio extracelular de BACE1 recombinante humano, el dominio extracelular de BACE2 humano recombinante o el dominio extracelular de la catepsina D sobre un sustrato de péptido corto con mayor susceptibilidad a BACE1 en presencia de YW412.8.31, o un anticuerpo IgG de control como se describe en el Ejemplo 2(B).

La Figura 10 representa los resultados de los experimentos realizados con diversos anticuerpos anti-BACE1 (LC6, LC9, YW412.8, YW412.8.30, YW412.8.31 y YW412.8.51) en el procesamiento de la proteína precursora amiloide recombinante (APP) en células 293-HEK, como se describe en el Ejemplo 2(C). Se usó un anticuerpo IgG que no se une a BACE1 (Xolair®) como control.

Las Figuras 11A-11D proporcionan gráficas que ilustran los efectos del anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 en el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) recombinante o endógena, como se describe en el Ejemplo 2(C). La Figura 11A muestra los resultados de experimentos usando células 293-HEK que expresan de manera estable APP humano de tipo silvestre. SMI de BACE1 es un inhibidor de BACE1 de molécula pequeña que se usó como control (Compuesto 8e - Charrier *et al.*, *J. Med. Chem.* 51:3313-3317 (2008)). La Figura 11B muestra los resultados de experimentos usando neuronas de los ganglios de la raíz dorsal E13.5 cultivadas a partir de ratones CD1 de tipo silvestre. Se realizaron experimentos adicionales con cultivos de neuronas corticales E16.5 (Figura 11C) y neuronas del hipocampo en cultivo E16.5 (Figura 11D) de ratones CD1 de tipo silvestre.

Las Figuras 12A-12C proporcionan imágenes de la absorción del anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 en neuronas primarias de ratón, como se describe en el Ejemplo 2(D). La Figura 12A muestra la interiorización del anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 en vesículas intracelulares en las neuronas. Se incubaron neuronas corticales embrionarias a 37 °C durante los tiempos indicados. Se detectó el YW412.8.31 unido en los compartimentos celulares superficiales (no permeabilizados) o internos (permeabilizados) con Alexa 568 α humano. La mayoría de la señal se interiorizó. El YW412.8.31 interiorizado se localizó en los compartimentos subcelulares mediante la tinción conjunta con los marcadores indicados para los compartimentos vasculares: endosomas tempranos (TfR); la red de trans-Golgi (VAMP4) y lisosoma (LAMP1). Barra de escala = 65 μ m (parte superior) y 20 μ m (parte inferior). La Figura 12B muestra una absorción del anticuerpo anti-BACE1 en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) E13.5 a dos temperaturas diferentes y tres puntos temporales diferentes, como se indica en la figura. Las células se permeabilizan para permitir el marcaje del anticuerpo BACE1 intracelular. Solo se marca el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 unido externamente en las células no permeabilizadas. La Figura 12(C) muestra la absorción en las neuronas corticales E16.5 del anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 de ratones con expresión de BACE1 o desactivación de BACE1.

La Figura 13 proporciona una representación gráfica de los resultados de ELISA del Ejemplo 3(A), que comparan la unión competitiva del anticuerpo anti-BACE1 YW412.8, consigo mismo, con otro anticuerpo anti-BACE1 (LC6), un péptido de unión a BACE1 de sitio activo (OM99-2 (CalBiochem®, n.º de catálogo 496000)) y un péptido de unión a BACE1 de exosito (BMS1) (péptido 1 de Kornacker *et al.*, *Biochemistry* 44:11567-11572 (2005)).

La Figura 14 muestra diferentes vistas de la estructura de 2,8 Å del Fab YW412.8.31 cocrystalizado con el dominio extracelular de BACE1 humano como se describe en el Ejemplo 3(B). El Fab se une a un exosito de BACE1 distal al sitio activo de secretasa, que se solapa parcialmente con otro exosito conocido por interactuar con ciertos péptidos que tienen propiedades inhibitorias de BACE1.

La Figura 15 proporciona una vista de primer plano de la interacción de los Fab YW412.8.31 con el dominio extracelular de BACE1 humano. BACE1 se muestra en la representación de la superficie y el Fab se muestra como cintas. La superficie punteada indica el epítipo de BACE1.

Las Figuras 16A y 16B muestran los resultados de experimentos para examinar la contribución de BACE1 a

niveles de $A\beta_{1-40}$ en ratones de tipo silvestre. Se examinaron los niveles de $A\beta_{1-40}$ en ratones BACE1+/+ frente a ratones BACE1-/. Los ratones recibieron una sola dosis de anticuerpo IgG de control o anticuerpo YW412.8.31 anti-BACE como se describe en el Ejemplo 4. La Figura 16A muestra los resultados de estudios genéticos que examinan la contribución de BACE1 a la producción de $A\beta_{1-40}$ en ratones. Los niveles de $A\beta_{1-40}$ observados en ratones con desactivación de BACE1 (BACE1-/-) proporcionan un control de cómo los inhibidores específicos de BACE1 alteran la producción de $A\beta_{1-40}$ en ratones de tipo silvestre. La Figura 16B muestra los efectos de la dosificación de IgG de control o anti-BACE1 YW412.8.31 (50 mg/kg) sobre la producción de $A\beta_{1-40}$ en el plasma y el SNC (corteza) de 24 o 48 horas después de la dosificación. Se administró una sola dosis de anticuerpo IgG de control o anti-BACE1 (50 mg/kg) mediante inyección i.v. a ratones C57B1/6. De 24 o 48 horas más tarde, se recogieron muestras de plasma y cerebro para analizar el $A\beta_{1-40}$. El $A\beta_{1-40}$ del plasma se redujo en un 35 % (a las 24 h) y el $A\beta_{1-40}$ cortical en ~20 %. Los valores representados son la media (\pm ETM) * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Las Figuras 17A-17B proporcionan resultados de los experimentos realizados con el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 *in vivo* descritos en el Ejemplo 4. La Figura 17A muestra gráficas de los niveles de $A\beta_{1-40}$ observados en el plasma y el hipocampo de los ratones tratados con el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 a dos concentraciones diferentes en comparación con el tratamiento con vehículo de control. La Figura 17B es una gráfica de farmacocinética individual frente a las lecturas farmacodinámicas, que indica que existe una relación PK/PD en este modelo de ratón para el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31.

Las Figuras 18A y 18B muestran una comparación de experimentos en los que ratones transgénicos hAPP recibieron el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 sistémicamente (Panel A, el mismo experimento que se describe en la Figura 17A vuelto a representar a modo comparativo) o mediante la infusión continua de i.c.v. (Panel B). En la Figura 18A, los animales recibieron vehículo o anticuerpo anti-BACE1 (30 o 100 mg/kg) mediante inyección i.p. (3 dosis cada 4 días). 2 horas después de la última dosis, se recogieron muestras de plasma y de cerebro para analizar $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$. Se redujeron los niveles de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ en plasma hasta niveles de control de ~30 % de anticuerpo anti-BACE tanto a 30 como a 100 mg/kg. Los niveles de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ del hipocampo se redujeron (13-22 %) por la alta dosis de anti-BACE1 (100 mg/kg), y los niveles de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ corticales mostraron una tendencia hacia la reducción (12-18 %). En la Figura 18B, se suministraron anticuerpo IgG de control o anticuerpo anti-BACE1 por infusión i.c.v. unilateral durante 7 días. Se observaron reducciones constantes en $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ a ambas dosis en la corteza (15-23 %) y en el hipocampo (15-20 %). El panel C muestra los niveles de anticuerpo anti-BACE1 en el cerebro tras la administración sistémica frente a la administración i.c.v. Los valores representados son la media (\pm ETM) * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Las Figuras 19A y 19B muestran el análisis PK de una sola dosis de anti-BACE1 YW412.8.31 (1 o 10 mg/kg) administrada mediante inyección i.v. a ratones BALB/C (Figura 19A). Se analizó la PK del suero a los 21 días después de la dosis. Se usaron dos ensayos de PK separados: un ensayo para detectar todos los anti-BACE1 del suero (mAb total), y un ensayo para detectar solamente el anti-BACE1 no unido en el suero (mAb libre). El análisis PK de una sola dosis en ratones BACE1+/+, BACE1+/- y BACE1-/- confirma la no linealidad observada en el estudio inicial, e indica que la eliminación potenciada está, en efecto, mediada por la diana (Figura 19B).

Las Figuras 20A y 20B muestran el análisis PK de macacos cangrejeros que han recibido anticuerpo IgG de control o anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 (30 mg/kg) mediante la administración i.v. Se midieron las concentraciones totales de anticuerpos anti-BACE1 o de control en suero de mono (Figura 20A) y muestras de LCR (Figura 20B) usando anticuerpo policlonal IgG anti-humano de cabra adsorbido en mono (Bethyl, Montgomery, TX) como se describe en el Ejemplo 5.

Las Figuras 21A-21D son los resultados de los experimentos descritos en el Ejemplo 5, en el que los macacos cangrejeros recibieron anticuerpo IgG de control o anti-BACE1 YW412.8.31 mediante la administración i.v. Las líneas sombreadas muestran los datos de los animales individuales, y las líneas continuas muestran las medias de los grupos. Se tomaron muestras de plasma y de LCR 7 días, 2 días y justo antes de la dosificación para fijar un valor medio de los niveles basales de $A\beta_{1-40}$ en cada mono individual. Se midieron los niveles de $A\beta_{1-40}$ en plasma (Figura 21A) y de $A\beta_{1-40}$ del LCR (Figura 21B) en diversos momentos. También se muestra la variabilidad a través de los animales en el nivel basal de $A\beta_{1-40}$ en plasma (Figura 21C) y LCR (Figura 21D).

Las Figuras 22A y 22B muestran la producción de $A\beta$ tras la administración sistémica de YW412.8.31 en ratones de tipo silvestre. La Figura 22A es una gráfica que muestra la producción de $A\beta_{1-40}$ después de una sola dosis de IgG de control o YW412.8.31 (100 mg/kg) administrada por inyección i.p. a ratones C57B1/6J. 4 horas más tarde, se recogieron muestras de plasma y de cerebro para analizar $A\beta_{1-40}$. El $A\beta_{1-40}$ en plasma se redujo en un 48 %, pero el $A\beta_{1-40}$ del cerebro anterior no se redujo en este paradigma. La Figura 22B es una gráfica que muestra la producción de $A\beta_{1-40}$ tras la administración de IgG de control o de YW412.8.31 (30 o 100 mg/kg) mediante 3 inyecciones i.p., con 4 días de diferencia. 4 horas después de la última dosis, se recogieron muestras de plasma y de cerebro para analizar el $A\beta_{1-40}$. El $A\beta_{1-40}$ en plasma se reduce en 50-53 %, mientras que el $A\beta_{1-40}$ del cerebro anterior no se reduce mediante la dosificación a 30 mg/kg, pero se reduce en un 42 % cuando se dosifica a 100 mg/kg. Los valores representados son la media (\pm ETM) * $p < 0,0001$.

Las Figuras 23A-23C muestran las secuencias de aminoácidos de cadena ligera del clon YW412.8.31 y las formas de afinidad madurada de YW412.8.31. Las Figuras 23A-23C representan las alineaciones de las secuencias de cadena ligera completas. Las secuencias de HVR para cada clon se indican por las regiones de los recuadros, indicando el primer recuadro HVR-L1 (SEQ ID NO: 7 - Figura 23A), indicando el segundo recuadro HVR-L2 (SEQ ID NO: 9 y 58-64 - Figura 23B), e indicando el tercer recuadro HVR-L3 (SEQ ID NO: 12 y 66-67 - Figura 23C).

Las Figuras 24A-24C muestran las secuencias de aminoácidos de cadena pesada del clon YW412.8.31 y las formas de afinidad madurada de YW412.8.31. Las Figuras 24A-24C representan las alineaciones de las

secuencias de cadena pesada completas. Las secuencias de HVR para cada clon se indican por las regiones de los recuadros, indicando el primer recuadro HVR-H1 (SEQ ID NO: 24 y 71-73 - Figura 24A), indicando el segundo recuadro HVR-H2 (SEQ ID NO: 24 y 74-78 - Figura 24B) e indicando el tercer recuadro HVR-H3 (SEQ ID NO: 25 y 79 - Figura 24C).

5 Las Figuras 25A y B representan gráficas que muestran la inhibición de BACE1 con clones YW412.8.31 y de afinidad madurada en un ensayo HTRF como se describe en el Ejemplo 6. Se ensayó la capacidad de los clones YW412.8.31.3S; YW412.8.31.9S; YW412.8.31.25S; YW412.8.31.58S; YW412.8.31.53; YW412.8.31.69; YW412.8.31.77; YW412.8.31.81S y YW412.8.31.89S para inhibir la actividad proteasa de BACE1.

10 Descripción detallada de realizaciones de la invención

I. DEFINICIONES

15 Un "marco conservado aceptor humano" para los fines del presente documento es un marco conservado que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco conservado de dominio variable de cadena ligera (VL) o marco conservado de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco conservado de inmunoglobulina humano o un marco conservado consenso humano, como se define a continuación. Un marco conservado aceptor humano "derivado de" un marco conservado de inmunoglobulina humano o un marco conservado consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, el marco conservado aceptor humano de VL es idéntico en la secuencia a la secuencia del marco conservado de inmunoglobulina humano de VL o la secuencia del marco conservado consenso humano.

25 La "afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A no ser que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse, en general, por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. A continuación, se describen realizaciones ilustrativas y de ejemplo específicas para medir la afinidad de unión.

35 Un anticuerpo de "afinidad madurada" se refiere a un anticuerpo con una o más modificaciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas modificaciones, dando lugar dichas modificaciones a una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

40 Las expresiones "anticuerpo anti-beta-secretasa", "anticuerpo anti-BACE1", "un anticuerpo que se une a beta-secretasa" y "un anticuerpo que se une a BACE1" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a BACE1 con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección de BACE1. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-BACE1 a una proteína no BACE1, no relacionada, es inferior al aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo a BACE1 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a BACE1 tiene una constante de disociación (Kd) $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o inferior, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-BACE1 se une a un epítipo de BACE1 que se conserva entre los BACE1 de diferentes especies e isoformas.

50 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada.

55 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula que no es un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une el antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

60 Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" como anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más, y por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más. En el presente documento, se proporciona ensayo de competición ilustrativo.

65 El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o

especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la muerte o destrucción de las células. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu), agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados más adelante.

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión de receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

La expresión "región Fc", en el presente documento, se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que contiene al menos una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, la región Fc de cadena pesada de IgG humana abarca desde Cys226 o desde Pro230 hasta el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no estar presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos de la región Fc o de una región constante es de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, también denominado índice de la UE, como se describe en Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Marco conservado" o "FR" se refiere a los restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable, en general, consiste en cuatro dominios: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR, en general, aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FFR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento indistintamente para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura esencialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora" y "cultivo de células hospedadoras" se usan indistintamente, y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma sin tener en cuenta el número de pasajes. La progenie puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácidos nucleicos a una célula madre, sino que puede contener mutaciones. En el presente documento, se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica rastreada o seleccionada en la célula transformada originalmente.

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos o de otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos.

Un "marco conservado consenso humano" es un marco conservado que representa los restos de aminoácido que aparecen más habitualmente en una selección de secuencias de marco conservado de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, "Sequence of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En una realización, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En una realización, para VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

- Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá esencialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o esencialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todos o esencialmente todos los FR corresponden a los de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivado de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización.
- La expresión "región hipervariable" o "HVR", cuando se usa en el presente documento, se refiere cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos de cuatro cadenas nativas comprenden seis HVR; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). Las HVR, en general, comprenden restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo estas últimas de mayor variabilidad de secuencia y/o que participan en el reconocimiento del antígeno. Los bucles hipervariables ilustrativos se producen en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las CDR ilustrativas (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR, en general, comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "restos determinantes de la especificidad", o "SDR", que son los restos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de las regiones CDR denominadas de forma abreviada CDR o a-CDR. Las a-CDR ilustrativas (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los restos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique lo contrario, los restos de HVR y otros restos del dominio variable (por ejemplo, los restos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.
- Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas, incluyendo, pero sin limitación, un agente citotóxico.
- Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.
- Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo está purificado hasta más del 95 % o 99 % de pureza determinada mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para consultar una revisión de los métodos para la evaluación de la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).
- Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen normalmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.
- "Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-BACE1" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha/s molécula/s de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y dicha/s molécula/s de ácido nucleico presente/s en una o más ubicaciones de una célula hospedadora.
- La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que se producen durante la producción de un preparado de anticuerpo monoclonal, estando, en general, dichas variantes presentes en cantidades menores. En contraste con los preparados de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de un preparado de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población esencialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, el método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación

en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulina humana, estando dichos métodos y otros métodos ilustrativos de fabricación de anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento.

5 Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a una fracción heteróloga (por ejemplo, una fracción citotóxica) o un radiomarcador. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

10 "Los anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Da, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que son enlaces de disulfuro. Desde el extremo N- a C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Del mismo modo, a partir del extremo N- a C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

20 El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, las dosis, la administración, la terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

25 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo de porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro del alcance de la técnica, por ejemplo, usando software informáticos disponibles para el público, tales como los software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para la alineación de secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es propiedad de Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU., Washington DC, 20559, donde se encuentra registrado bajo derechos de autor de EE.UU. n.º TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

45 En situaciones en las que se usa ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que, como alternativa, puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

50 donde X es el número de restos de aminoácidos identificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos de B. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual a % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A, a menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

60 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a un preparado que está en una forma que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en el mismo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

65 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico par un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, un excipiente, un estabilizante o un conservante.

El término "BACE1," como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier beta-secretasa 1 nativa (también denominada enzima 1 de escisión de la proteína precursora amiloide en el sitio β , aspártico proteasa asociada a la membrana 2, memapsina 2, aspartil proteasa 2 o Asp2) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca BACE1 no procesada, "de longitud completa", así como cualquier forma de BACE1 que procede del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de BACE1, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. En la SEQ ID NO: 49 que figura a continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido BACE1 ilustrativo, y es la secuencia de BACE1 humana, la isoforma A publicada en Vassar *et al.*, *Science* 286:735-741 (1999).

MAQALPWLLLWMGAGVLP AHGTQH GIRLPLRSGLGGAPLGLR LPRETDEEPEEPGR
 RGSFVEMVDNLRGKSGQGYVEMTVGSPQTLNILDVDTGSSNFAVGAAPHPFLHRY
 YQRQLSSTYRDLRKG VYVPYTQGWEGELGTDLVSIPHGPNVTVRANIAAITESDKF
 FINGSNWEGILGLAYAEIARPDDSLPFFDSL VKQTHV PNLFSLQLCGAGFPLNQSEVL
 ASVGGSMIIGGIDHSLYTGSLWYTPIRREWYYEVIIVRVEINGQDLKMDCKEYNYDKS
 IVDSGTTNLR LPKKVFEAAVKSIIKAASSTEKFPDGFWLGEQLVCWQAGTTPWNIFPVI
 SLYLMGEVTNQSF RITILPQQYLRPVEDVATSQDDCYKFAISQSSTGTVMGAVIMEGF
 YVVFDRARKRIGFAVSACHVHDEFRTAAVEGPFVTLDMEDCGYNIPQTDESTLMTIA
 YVMAAICALFMLPLCLMVCQWCCLRCLRQQHDDFADDISLLK (SEQ ID NO:49)

Existen otras varias isoformas de BACE1 humana incluyendo isoformas B, C y D. Véase Entrada P56817 de UniProtKB/Swiss-Prot. La isoforma B se muestra en SEQ ID NO: 50, y difiere de la isoforma A (SEQ ID NO: 49) en que faltan los aminoácidos 190-214 (es decir, eliminación de los aminoácidos 190-214 de SEQ ID NO: 49). La isoforma C se muestra en SEQ ID NO: 51 y difiere de la isoforma A (SEQ ID NO: 49) en que faltan los aminoácidos 146-189 (es decir, eliminación de los aminoácidos 146-189 de (SEQ ID NO: 49)). La isoforma D se muestra en la SEQ ID NO: 52, y difiere de la isoforma A (SEQ ID NO: 49) en que faltan los aminoácidos 146-189 y 190-214 (es decir, eliminación de los aminoácidos 146-189 y 190-214 de SEQ ID NO: 49).

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que está siendo tratado, y se pueden realizar ya sea para la profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, la prevención de la aparición o de la recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado patológico y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para retardar la progresión de una enfermedad.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo, en general, tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* "Kuby Immunology", 6ª ed., W. H. Freeman *et al.*, página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede bastar para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para explorar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está enlazado. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico de autorreplicación, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Las expresiones "trastorno neurológico" o "enfermedad neurológica" se refieren o describen una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso central y/o periférico en mamíferos. Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, la siguiente lista de enfermedades y trastornos. Los trastornos neuropáticos son enfermedades o anomalías del sistema nervioso que se caracterizan por señales nerviosas inapropiadas o descontroladas, o por falta

de las mismas, e incluyen, pero sin limitación, dolor crónico (incluyendo dolor nociceptivo (dolor causado por una lesión en tejidos del cuerpo, incluyendo el dolor relacionado con el cáncer), dolor neuropático (dolor causado por anomalías en los nervios, la médula espinal o el cerebro) y el dolor psicógeno (total o mayormente relacionado con un trastorno psicológico), dolor de cabeza, migraña, neuropatía, y los síntomas y síndromes que suelen acompañar a dichos trastornos neuropáticos tales como vértigo o náuseas. Las amiloidosis son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con los depósitos proteicos extracelulares del SNC, incluyendo, pero sin limitación, la amiloidosis secundaria, amiloidosis relacionada con la edad, enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve (MCI), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiiforme transmisible, demencia relacionada con el VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis con cuerpos de inclusión (IBM) y enfermedades oculares relacionadas con la deposición de amiloide-beta (es decir, degeneración macular, neuropatía óptica relacionadas con drusas y cataratas). Los cánceres del SNC se caracterizan por la proliferación aberrante de una o más células del SNC (es decir, una célula neuronal), e incluyen, pero sin limitación, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, astrocitoma, neuroma acústico, condroma, oligodendroglioma, meduloblastomas, ganglioglioma, schwannoma, neurofibroma, neuroblastoma, y tumores extradurales, intramedulares o intradurales. Las enfermedades o los trastornos oculares son enfermedades o trastornos del ojo, lo que para los fines del presente documento se considera un órgano del SNC sometido a la barrera hematoencefálica. Las enfermedades o los trastornos oculares incluyen, pero sin limitación, trastornos de la esclerótica, de la córnea, del iris y del cuerpo ciliar (es decir, escleritis, queratitis, úlcera corneal, abrasión corneal, ceguera de la nieve, ojo de arco, queratopatía punteada superficial de Thygeson, neovascularización corneal, distrofia de Fuchs, queratocono, queratoconjuntivitis seca, iritis y uveítis), trastornos del cristalino (es decir, cataratas), trastornos de la coroides y la retina (es decir, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía diabética, retinopatía, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular (húmeda o seca), membrana epirretiniana, retinitis pigmentosa y edema macular), glaucoma, flotadores, trastornos del nervio óptico y las vías visuales (es decir, neuropatía óptica hereditaria de Leber y drusas del disco óptico), trastornos de los músculos oculares/acomodación del movimiento binocular/refracción (es decir, estrabismo, oftalmoparesia, oftalmoplejía progresiva externa, esotropía, exotropía, hipermetropía, miopía, astigmatismo, anisometropía, presbicia y oftalmoplejía), trastornos de la visión y ceguera (es decir, ambliopía, amaurosis congénita de Lever, escotoma, daltonismo, acromatopsia, nictalopia, ceguera, oncocercosis y micro-optalmia/coloboma), enrojecimiento de los ojos, pupila de Argyll Robertson, queratomicosis, xeroftalmia y andaniridia. Las infecciones virales o microbianas del SNC incluyen, pero sin limitación, infecciones por virus (es decir, gripe, VIH, virus de la polio, rubéola), bacterias (es decir, *Neisseria* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *Pneumococcus* sp., *Meningococcus* sp., *Haemophilus* sp. y *Mycobacterium tuberculosis*) y otros microorganismos tales como hongos (es decir, levaduras, *Cryptococcus neoformans*), parásitos (es decir, *Toxoplasma gondii*) o amebas que producen fisiopatologías del SNC incluyendo, pero sin limitación, meningitis, encefalitis, mielitis, vasculitis y absceso, que pueden ser agudas o crónicas. La inflamación del SNC es la inflamación que se produce por una lesión en el SNC, que puede ser una lesión física (es decir, debido a un accidente, cirugía, traumatismo cerebral, lesión de la médula espinal, conmoción cerebral) o una lesión debida a o en relación con una o más otras enfermedades o trastornos del SNC (es decir, absceso, cáncer, infección viral o microbiana). La isquemia del SNC, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de trastornos relacionados con el flujo de sangre o el comportamiento vascular aberrante en el cerebro, o las causas de los mismos, e incluye, pero sin limitación, isquemia cerebral focal, isquemia cerebral global, apoplejía (es decir, hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracerebral) y aneurisma. Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la pérdida de función o la muerte de células neuronales en el SNC, e incluyen, pero sin limitación, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, degeneración causada por o asociada con una amiloidosis, ataxia de Friedreich, degeneración del lóbulo frontotemporal, enfermedad de Kennedy, atrofia de múltiples sistemas, esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, atrofia muscular espinal, mielitis transversa, enfermedad de Refsum, y ataxia espinocerebelosa. Las enfermedades y los trastornos de convulsiones del SNC implican la conducción eléctrica inapropiada y/o anómala en el SNC, e incluyen, pero sin limitación, epilepsia (es decir, crisis de ausencia, convulsiones atónicas, epilepsia rolándica benigna, ausencia infantil, convulsiones clónicas, convulsiones parciales complejas, epilepsia del lóbulo frontal, convulsiones febriles, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia juvenil, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Dravet, síndrome DE Otahara, síndrome de West, convulsiones mioclónicas, trastornos mitocondriales, epilepsias mioclónicas progresivas, convulsiones psicógenas, epilepsia refleja, síndrome de Rasmussen, convulsiones parciales simples, ataques generalizados secundarios, epilepsia del lóbulo temporal, convulsiones tónico-clónicas, ataques tónicos, ataques psicomotores, epilepsia límbica, convulsiones de inicio parcial, convulsiones de inicio generalizado, estado de mal epiléptico, epilepsia abdominal, convulsiones acinéticas, convulsiones autonómicas, mioclonía bilateral masiva, epilepsia catamenial, ataques de gota, convulsiones emocionales, convulsiones focales, convulsiones gelásticas, crisis epiléptica jacksoniana, enfermedad de Lafora, convulsiones motoras, convulsiones multifocales, convulsiones nocturnas, convulsiones por fotofobia, pseudo convulsiones, convulsiones sensoriales, convulsiones sutiles, convulsiones selváticas, convulsiones por abstinencia y ataques reflejos visuales). Los trastornos del comportamiento son los trastornos del SNC caracterizados por un comportamiento aberrante por parte del sujeto afectado, e incluyen, pero sin limitación, trastornos del sueño (por ejemplo, insomnio, parasomnias,

terrores nocturnos, trastornos del sueño del ritmo circadiano y narcolepsia), trastornos del estado de ánimo (por ejemplo, depresión, depresión suicida, ansiedad, trastornos afectivos crónicos, fobias, ataques de pánico, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastorno por déficit de atención (ADD), síndrome de fatiga crónica, agorafobia, trastorno de estrés postraumático, trastorno bipolar), trastornos de la alimentación (es decir, anorexia o bulimia), psicosis, trastornos de comportamiento de desarrollo (es decir, autismo, síndrome de Rett, síndrome de Asperger), trastornos de personalidad y trastornos psicóticos (es decir, esquizofrenia, trastorno delirante y similares). Las enfermedades de almacenamiento lisosomal son trastornos metabólicos que, en algunos casos, están asociados con el SNC o tienen síntomas específicos del SNC; dichos trastornos incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, mucopolisacaridosis (tipos I, II, III, IV, V, VI y VII), enfermedad de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis GM1, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Farber, leucodistrofia de Canavan y lipofuscinosis ceroides neuronales de tipo 1 y 2, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pompe y enfermedad de Krabbe.

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en anticuerpos que se unen a BACE1 y reducen y/o inhiben la actividad de BACE1. En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen al sitio activo o a un exosito de BACE1.

A. Ejemplos de anticuerpos Anti-BACE1

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-BACE1 que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas entre (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71, 72, 73 o 120; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 29, 46, 69, 74, 75, 76, 77, 78 o 121; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, 30, 47, 70, 79 o 122; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 8, 17, 35 o 42; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 18, 36-39, 41, 43, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 o 118; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11-16, 19, 40, 44, 57, 65, 66, 67 o 119.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo que comprende al menos uno, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas entre (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71-73 o 120; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 29, 46, 69, 74-78 o 121; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, 30, 47, 70, 79 o 122.

En un aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 73. En otro aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 74 o SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 o SEQ ID NO: 78. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 79. En un aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28. En otro aspecto, el anticuerpo comprende HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29. En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 30.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; o el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; o el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; o el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (b) HVR-H2

- que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; o el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 NO: 12; o el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.
- En otro aspecto, un anticuerpo de la divulgación comprende (a) un dominio VH que comprende al menos uno, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas entre (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID NO: 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71-73 o 120 (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID NO: 24, 29, 46, 69, 74-78 o 121 e (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 25, 30, 47, 70, 79 o 122; y (b) un dominio VL que comprende al menos uno, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas entre (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID NO: 7, 8, 17, 35 o 42, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID NO: 9, 10, 18, 36-39, 41, 43, 56, 58-64 o 118, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID NO: 11-16, 19, 40, 44, 57, 65-67 o 119.
- En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 12.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada entre HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, en las que HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GFX_{30}FX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}IH$ (SEQ ID NO: 45), en la que $X_{30} = N$ o T ; $X_{31} = S, L$ o Y ; $X_{32} = G$ o Y ; $X_{33} = Y$ o S ; y $X_{34} = A, G$ o S ; en las que HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{35}X_{36}ISPX_{37}X_{38}GX_{39}TX_{40}YADSVKG$ (SEQ ID NO: 46), en la que $X_{35} = A$ o G ; $X_{36} = W$ o S ; $X_{37} = A$ o Y ; $X_{38} = G$ o S ; $X_{39} = S$ o Y ; y $X_{40} = D$ o S ; y en las que HVR-H3 comprende la secuencia $X_{41}PX_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}MDY$ (SEQ ID NO: 47), en la que $X_{41} = Q$ o G ; $X_{42} = T$ o F ; $X_{43} = H$ o S ; $X_{44} = Y$ o P ; $X_{45} = Y$ o W ; $X_{46} = Y$ o V , y en la que X_{47} incluye opcionalmente la secuencia YAKGYKA (SEQ ID NO: 48).
- En ciertos aspectos, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada entre HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en las que HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GX_{71}X_{72}X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}IH$ (SEQ ID NO: 120), en la que $X_{71} = F$ o Y ; $X_{72} = F, N$ o T ; $X_{73} = F$ o Y ; $X_{74} = L, Q, I, S$ o Y ; $X_{75} = G$ o Y ; $X_{76} = Y$ o S ; y $X_{77} = A, G$ o S ; HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{78}X_{79}ISPX_{80}X_{82}GX_{83}X_{84}YADSVKG$ (SEQ ID NO: 121), en la que $X_{78} = A$ o G ; $X_{79} = W$ o S ; $X_{80} = A, S, Q$ o Y ; $X_{81} = G$ o S ; $X_{82} = S, K, L$ o Y ; $X_{83} = T$ o Y ; y $X_{84} = D$ o S ; y HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{85}PX_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}MDY$ (SEQ ID NO: 122), en la que $X_{85} = Q$ o G ; $X_{86} = T$ o F ; $X_{87} = H, Y$ o S ; $X_{88} = Y$ o P ; $X_{89} = Y$ o W ; $X_{90} = Y$ o V , y en la que X_{91} incluye opcionalmente la secuencia YAKGYKA (SEQ ID NO: 48).
- En cierto aspecto, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada entre HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, en las que HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_{17}VX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}A$ (SEQ ID NO: 42), en la que $X_{17} = S, D$ o V ; $X_{18} = S$ o A ; $X_{19} = S, T$ o N ; $X_{20} = A$ o S ; $X_{21} = V$ o L , en las que HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{22}ASX_{23}LYS$ (SEQ ID NO: 43), en la que $X_{22} = S, W, Y$ o L ; $X_{23} = F, S$ o W , y en las que HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}T$ (SEQ ID NO: 44), en la que $X_{24} = S, F, G, D$ o Y ; $X_{25} = Y, P, S$ o A ; $X_{26} = Y, T$ o N ; $X_{27} = T, Y, D$ o S ; $X_{28} = P$ o L ; y $X_{29} = F, P$ o T .
- En cierto aspecto, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en las que HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_{17}VX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}A$ (SEQ ID NO: 42), en la que $X_{17} = S, D$ o V ; $X_{18} = S$ o A ; $X_{19} = S, T$ o N ; $X_{20} = A$ o S ; $X_{21} = V$ o L , en las que HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{62}ASX_{63}X_{64}YX_{65}$ (SEQ ID NO: 118), en la que $X_{62} = S, W, Y, F$ o L ; $X_{63} = F, S, Y$ o W ; $X_{64} = L$ o R ; $X_{65} = S, P, R, K$ o W , y HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}T$ (SEQ ID NO: 119), en la que $X_{66} = S, F, G, D$ o Y ; $X_{67} = Y, P, S$ o A ; $X_{68} = Y, T$ o N ; $X_{69} = T, Y, D$ o S ; $X_{70} = P, Q, S, K$ o L ; y $X_{71} = F, P$ o T .
- En cierto aspecto, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada entre HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, en las que HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_1VX_2X_3X_4X_5A$ (SEQ ID NO: 17), en la que $X_1 = D$ o V ; $X_2 = S$ o A ; $X_3 = T$ o N ; $X_4 = S$ o A ; $X_5 = V$ o L , en las que HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_6ASFLYS$ (SEQ ID NO: 18), en la que $X_6 = S$ o L , y en las que la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}T$ (SEQ ID NO: 19), en la que $X_7 = S, F, G, D$ o Y ; $X_8 = Y, P, S$ o A ; $X_9 = T$ o N ; $X_{10} = T, Y, D$ o S ; $X_{11} = P$ o L ; $X_{12} = P$ o T .
- En cierto aspecto, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada entre HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, en las que HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_1VX_2X_3X_4X_5A$ (SEQ ID NO: 17), en la que $X = D$

o V; X₂ = S o A; X₃ = T o N; X₄ = S o A; X₅ = V o L, en las que HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos X₄₈ASX₄₉X₅₀YX₅₁ (SEQ ID NO: 56), en la que X₄₈ = S o F; X₄₉ = F o Y; X₅₀ = L o R; X₅₁ = S, P, R, K o W, en las que HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos QQFPTYX₅₂PT (SEQ ID NO: 57), en la que X₅₂ = L, Q, S o K.

5 En cierto aspecto, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada entre HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, en las que HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos GFTFX₁₃GYX₁₄IH (SEQ ID NO: 26), en la que X₁₃ = S o L y X₁₄ = A o G, en las que la HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos GWISPAGGSTDYADSVKG (SEQ ID NO: 24) y en las que la HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos GPFSPWVMDY (SEQ ID NO: 25).

10 En cierto aspecto, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada entre HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, en las que HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos GX₅₃X₅₄X₅₅X₅₆GYGIH (SEQ ID NO: 68), en la que X₅₃ = F o Y; X₅₄ = T o F; X₅₅ = F o Y; X₅₆ = L, Q o I, en las que HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos GWISPX₅₇X₅₈GX₅₉X₆₀DYADSVKG (SEQ ID NO: 69), en la que X₅₇ = A, S o Q; X₅₈ = G o S; X₅₉ = S, K o L; X₆₀ = T o Y, y en las que la secuencia HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos GPFX₆₁PWVMDY (SEQ ID NO: 70), en la que X₆₁ = S o Y.

15 En cierto aspecto, el anticuerpo comprende al menos una secuencia seleccionada entre HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, en las que HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSAVA (SEQ ID NO: 35), en las que HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos X₁₅ASX₁₆LYS (SEQ ID NO: 41), en la que X₁₅ = S, W o Y y X₁₆ = S o W, y en las que HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYSYSPFT (SEQ ID NO: 40).

En ciertos aspectos, uno cualquiera o más aminoácidos de un anticuerpo anti-BACE1, como se ha proporcionado anteriormente, están sustituidos en las siguientes posiciones de la HVR:

25 en HVR-H1 (SEQ ID NO: 26): posiciones 5 y 8;
 en HVR-L1 (SEQ ID NO: 17): posiciones 5, 7, 8, 9 y 10;
 en HVR-L2 (SEQ ID NO: 18): posición 1 o HVR-L2 (SEQ ID NO: 41) posiciones 1 y 4; y
 en HVR-L3 (SEQ ID NO: 19): posiciones 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

30 En ciertos aspectos, las sustituciones son sustituciones conservativas, como se proporcionan en el presente documento. En ciertos aspectos, se pueden realizar una cualquiera o más de las siguientes sustituciones en cualquier combinación:

35 en HVR-H1 (SEQ ID NO: 26): serina o leucina en la posición 5 y alanina o glicina en la posición 8;
 en HVR-L1 (SEQ ID NO: 17): ácido aspártico o valina en la posición 5; serina o alanina en la posición 7;
 treonina o asparagina en la posición 8; serina o alanina en la posición 9 y valina o leucina en la posición 10;
 en HVR-L2 (SEQ ID NO: 18): serina o leucina en la posición 1 o HVR-L2 (SEQ ID NO: 41) serina, tirosina o triptófano en la posición 1, o tirosina, serina o triptófano en la posición 4; y
 en HVR-L3 (SEQ ID NO: 19): serina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico o tirosina en la posición 3;
 40 tirosina o prolina en la posición 4, serina, alanina, treonina o asparagina en la posición 5; tirosina, treonina, ácido aspártico o serina en la posición 6, ácido aspártico, serina, prolina o leucina en la posición 7; y prolina o treonina en la posición 8.

45 En ciertos aspectos, las sustituciones son sustituciones conservativas, como se proporcionan en el presente documento. En ciertos aspectos, se pueden realizar una cualquiera o más de las siguientes sustituciones en cualquier combinación:

50 en HVR-H1 (SEQ ID NO: 26): S5L y A8G;
 en HVR-L1 (SEQ ID NO: 17): D5V; S7A; T8N; S9A y V10L;
 en HVR-L2 (SEQ ID NO: 18): S1L o HVR-L2 (SEQ ID NO: 41) posiciones S1W o Y y S4W; y
 en HVR-L3 (SEQ ID NO: 19): posiciones S3F, G, D o Y1; Y4P, S o A; T5N; T6Y, D o S; P7L y P8T.

En ciertos aspectos, uno cualquiera o más aminoácidos de un anticuerpo anti-BACE1, como se han proporcionado anteriormente, están sustituidos en las siguientes posiciones de la HVR:

55 en HVR-H1 (SEQ ID NO: 120): posiciones 2, 3, 5, 6, 7 y 8;
 en HVR-H2 (SEQ ID NO: 121): posiciones 1, 2, 6, 7, 9, 10, y 11;
 en HVR-H3 (SEQ ID NO: 122) posiciones 1, 3, 4, 5, 6, 7, y 8;
 en HVR-L1 (SEQ ID NO: 42): posiciones 5, 7, 8, 9 y 10;
 60 en HVR-L2 (SEQ ID NO: 118): posiciones 1, 4, 5 y 7; y
 en HVR-L3 (SEQ ID NO: 119): posiciones 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

En ciertos aspectos, las sustituciones son sustituciones conservativas, como se proporcionan en el presente documento.

65

Las posibles combinaciones de las sustituciones anteriores están abarcadas por las secuencias consenso de SEQ ID NO: 42-47 y 118-122 como se ha descrito anteriormente.

En cualquiera de los aspectos anteriores, un anticuerpo anti-BACE1 está humanizado. En un aspecto, un anticuerpo anti-BACE1 comprende HVR como las de cualquiera de los aspectos anteriores, y comprende además un marco conservado humano aceptor, por ejemplo, un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano. En otro aspecto, un anticuerpo anti-BACE1 comprende HVR como las de cualquiera de los aspectos anteriores, y comprende además una VH o VL que comprende una secuencia de FR1, FR2, FR3 o FR4 de SEQ ID NO: 1-6, 20, 21, 27, 31-34, 80-98 y 99-117.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-BACE1 comprende una secuencia del dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene una identidad de secuencia del al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 20, 21, 27 y 80-98. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH que tiene una identidad del al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-BACE1 que comprende dicha secuencia conserva la capacidad para unirse a BACE1 y/o inhibir o reducir la actividad de BACE1. En ciertos aspectos, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 20, 21, 27 y 80-98. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o eliminaciones tienen lugar fuera de la HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-BACE1 comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 20, 21, 27 o 80-98, incluyendo las modificaciones posteriores a la traducción de dicha secuencia. En una determinada realización, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71, 72, 73 o 120, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 29, 46, 69, 74, 75, 76, 77, 78 o 121, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, 30, 47, 70, 79 o 122.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-BACE1 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas entre la (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las Figuras 1(B), 2(B) y 24(A); (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las Figuras 1(B), 2(B) y 24(B); (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las Figuras 1(B), 2(B) y 24(C); (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las Figuras 1(A), 2(A) y 23(A); (e) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las Figuras 1(A), 2(A) y 23(B); y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las Figuras 1(A) y 2(A) y 23(C).

En otro aspecto, se desvela un anticuerpo anti-BACE1, anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene una identidad de secuencia del al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 1-6, 31-34 y 99-117. En ciertos aspectos, una secuencia de VL que tiene una identidad del al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-BACE1 que comprende dicha secuencia conserva la capacidad para unirse a BACE1 y/o inhibir o reducir la actividad de BACE1. En ciertos aspectos, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 1-6, 31-34 y 99-117. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de HVR (es decir, en los FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-BACE1 comprende la secuencia de VL de SEQ ID NO: 1-6, 31-34 o 99-117, incluyendo las modificaciones posteriores a la traducción de dicha secuencia. En un aspecto particular, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 8, 17, 35 o 42; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 18, 36-39, 41, 43 y 56, 58-64 o 118; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11-16, 19, 40, 44, 57, 65, 66, 67 o 119.

En otro aspecto, se desvela un anticuerpo anti-BACE, anticuerpo que comprende una VH como la de cualquiera de los aspectos desvelados anteriormente, y una VL como la de cualquiera de los aspectos desvelados anteriormente. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, incluyendo las modificaciones posteriores a la traducción de dichas secuencias.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-BACE1 proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en ciertos aspectos, se desvela un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-BACE1 que comprende una secuencia de VH seleccionada entre SEQ ID NO: 20, 21, 27 y 80-98 y una secuencia de VL seleccionada entre SEQ ID NO: 1-6, 31-34 y 99-117. En ciertos aspectos, se desvela un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-BACE1 que comprende las secuencias de VH y VL de SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 2, respectivamente.

En ciertos aspectos, se desvela un anticuerpo que se une a un epítipo en BACE1 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 314 SER, 316 GLU, 317 LYS, 318 PHE, 319 PRO, 327

GLN, 328 LEU, 329 VAL, 330 CYS, 331 TRP, 332 GLN, 333 ALA, 335 THR, 337 PRO, 340 ILE, 375 THR, 378 ASP, 380 CYS, 426 PHE de SEQ ID NO: 49.

5 En ciertos aspectos, se desvela un anticuerpo que se une a un epítipo en BACE1 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEQ ID NO: 49. En otros aspectos, el epítipo conformacional comprende aminoácidos que corresponden a 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEQ ID NO: 49. Se apreciará que los aminoácidos identificados en el epítipo de BACE1 corresponden a la secuencia de la isoforma A de BACE1 humana. Sin embargo, el epítipo conformacional de BACE1 descrito también abarca los aminoácidos correspondientes de otras variantes e isoformas de BACE1, y el epítipo puede incluir aminoácidos distintos de los restos especificados.

15 En ciertos aspectos, se desvela un anticuerpo que se une a un epítipo en BACE1 que comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres regiones de aminoácidos de BACE1 que corresponden a los aminoácidos 315-318 de SEQ ID NO: 49; aminoácidos 331-335 de SEQ ID NO: 49; aminoácidos 370-381 de SEQ ID NO: 49; o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el anticuerpo se une a un epítipo de BACE1 que comprende los aminoácidos 315-318, 331-335 y 370-381 de SEQ ID NO: 49.

20 En otro aspecto, se desvela un anticuerpo que se une a un epítipo en BACE1 que produce un cambio conformacional en los sitios P6 y/o P7 (Turner *et al.*, *Biochemistry* 44:105-112 (2005)) de BACE1 tras la unión con respecto a BACE1 sin la unión del anticuerpo. En un aspecto adicional, se desvela un anticuerpo que se une a un epítipo en BACE1 que induce a los aminoácidos 218-231 de SEQ ID NO: 49 de BACE1 a adoptar una estructura de bucle aleatorio. Los aminoácidos 218-231 de SEQ ID NO: 49 de BACE1 existen en una estructura α -helicoidal del complejo unido al sustrato.

En otro aspecto, se desvela un anticuerpo que se une a un sitio en BACE1 según lo indicado en las Figuras 14 y 15, y descrito en la estructura cristalina de BACE1 y el anticuerpo anti-BACE1, YW412.8.31 (Ejemplo 3(B)).

30 En otros aspectos, se desvela un anticuerpo que se une a un exosítio en BACE1. En una realización, el exosítio de BACE1 es el mismo exosítio que el identificado por Kornacker *et al.*, *Biochem.* 44:11567-11573 (2005). En un aspecto, se desvela un anticuerpo que compite con los péptidos identificados en Kornacker *et al.*, *Biochem.* 44:11567-11573 (2005), (es decir, los Péptidos 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A y L11A) para la unión a BACE1.

35 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que compite por la unión (por ejemplo, se une al mismo epítipo) que cualquier anticuerpo anti-BACE1 descrito en el presente documento.

40 En un aspecto adicional de la divulgación, un anticuerpo anti-BACE1 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-BACE1 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto u otra clase de anticuerpo o isotipo como se define en el presente documento.

45 En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-BACE1 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede presentar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, que se describen en los Apartados 1-7 que figuran a continuación.

1. Afinidad de los anticuerpos

50 En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (Kd) $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o inferior, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

55 En una realización, Kd se mide mediante un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. Se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con [¹²⁵I] en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (termo Scientific) durante una noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y se bloquean posteriormente con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla antígeno marcado con [¹²⁵I] 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coincidiendo con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). A continuación, se incuba el Fab de interés durante una noche; sin embargo, la

incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Tras ello, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después, se retira la solución y se lava la placa ocho veces con polisorbato 20 al 0,1 % (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 μ l/pocillo de agente de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard), y se cuentan las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se seleccionan las concentraciones de cada Fab, que dan menos de o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas de CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 μ g/ml (~0,2 μ M) antes de inyección a un caudal de 5 μ l/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 al 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 μ l/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (software de evaluación BIACORE® versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como el cociente de k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de disociación es superior a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de desactivación de la fluorescencia que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectrómetro, tal como una espectrofotómetro dotado de detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada

2. Fragmentos de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de los fragmentos de anticuerpos, véase Hudson *et al.* *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthun, en "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pág. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE.UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para una descripción de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítomos de unión al receptor de salvamento y que tienen una mayor semivida *in vivo*, véase la patente de EE.UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 90: 6444-6448 (1993).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada, o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y en Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase conmutada", en el que la clase o subclase se ha modificado con respecto a la del anticuerpo parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Por lo general, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad hacia los seres humanos, al tiempo que conservar la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o

más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o partes de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano, y los FR (o partes de los mismos) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos de FR de un anticuerpo humanizado están sustituidos con los restos correspondientes de un anticuerpo no humano, (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los restos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para su fabricación se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE.UU. n.º 5.821.337; 7.527.791; 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe "la restauración"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe la "combinación de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describe la metodología de "selección guiada" para la combinación de FR).

Las regiones marco conservadas humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, pero sin limitación: regiones marco conservadas seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al. J. Immunol.* 151: 2296 (1993)); regiones marco conservadas derivadas de la secuencia consenso de los anticuerpos humanos de un determinado subgrupo de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:4285 (1992); y Presta *et al. J. Immunol.*, 151:2623 (1993); regiones marco conservadas maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones marco conservadas de línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco conservadas derivadas del rastreo de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición al antígeno. Dichos animales normalmente contienen todos o una parte de los locus de inmunoglobulina humana, que sustituyen los locus endógenos de inmunoglobulina, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógenos, en general, se han inactivado. Para una revisión de los métodos de obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véase también, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE.UU. n.º 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®; la patente de EE.UU. n.º 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también se pueden fabricar mediante métodos basados en el hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-ser humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados mediante la tecnología del hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Pro. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 103:3557-3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n.º 7.18.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM monoclonales humanos a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humanos-humanos). La tecnología del hibridoma humano (tecnología del trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, "Histology and Histopathology", 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, "Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology", 27(3):185-91 (2005).

Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante el aislamiento de secuencias de dominio variable de clones de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos derivadas de seres humanos. Dichas secuencias de dominio variable se pueden combinar después con un dominio constante humano deseado. A continuación, se describen las técnicas de selección de anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos.

5. Anticuerpos derivados de bibliotecas

Los anticuerpos de la invención pueden aislarse mediante el rastreo de bibliotecas combinatorias de anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conoce una variedad de métodos en la técnica para generar bibliotecas de presentación en fagos y explorar dichas bibliotecas de anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en "Methods in Molecular Biology" 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N. J., 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en "Methods in Molecular Biology" 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N. J., 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En ciertos métodos de presentación en fagos, se clonan repertorios de genes de VH y VL por separado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que se pueden explorar en busca del fago de unión al antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos suelen mostrar fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio no tratado previamente puede clonarse (por ejemplo, de ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos contra una amplia selección de no autoantígenos y también autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J* 12: 725-734 (1993). Por último, también se pueden fabricar bibliotecas no tratadas previamente de manera sintética mediante la clonación de segmentos de genes V no reordenados a partir de células madre, y el uso de cebadores de PCR que contengan la secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para realizar el reordenamiento *in vitro*, según lo descrito por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen las bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE.UU. n.º 5.750.373, y la publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

En el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por BACE1 y la otra es por cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de BACE1. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan BACE1. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas de fabricación de anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y la ingeniería de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden fabricar mediante los efectos de dirección electrostáticos de ingeniería para la fabricación de moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); la reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.676.980, y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpo" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147:60 (1991).

También se incluye en el presente documento el diseño de anticuerpos con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye un "Fab de acción doble" o un "DAF" que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a BACE1, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

7. Variantes de anticuerpo

En ciertas realizaciones, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para obtenerse la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, la unión al antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y eliminación

En ciertas realizaciones, se desvelan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y los FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 con el encabezamiento de "sustituciones conservativas". Más cambios sustanciales se proporcionan en la Tabla 1 con el encabezamiento de "sustituciones ilustrativas", y como se describe posteriormente en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y explorarse los productos en busca de una actividad deseada, por ejemplo, la conservación/mejora de la unión al antígeno, reducción de la inmunogenicidad, o mejora de ADCC o CDC.

TABLA 1

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

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

5 Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la/s variante/s resultante/s seleccionada/s para el estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, aumento de la afinidad, reducción de la inmunogenicidad) en relación con el anticuerpo parental y/o tendrán ciertas propiedades biológicas esencialmente conservadas del anticuerpo parental. Una variante de sustitución ilustrativa es un anticuerpo de afinidad madurada, que puede generarse convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de afinidad basadas en la presentación en fagos tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más restos de HVR y se presentan las variantes de anticuerpos en fagos y se rastrean para determinar una actividad biológica en particular (por ejemplo, afinidad de unión).

15 Se pueden realizar modificaciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas modificaciones se pueden realizar en "puntos calientes" de las HVR, es decir, restos codificados por codones que sufren mutación con una alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)) y/o SDR (a-CDR), analizándose la variante de VH o VL resultante para determinar la afinidad de unión. La maduración de afinidad mediante la construcción y la reelección a partir de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en "Methods in Molecular Biology" 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas realizaciones de maduración de afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para la maduración mediante cualquiera de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, intercambio de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca se rastrea luego para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método de introducción de diversidad implica metodologías dirigidas a las HVR, en las que se aleatorizan varios restos de HVR (por ejemplo, 4-6 restos a la vez). Los restos de las HVR que participan en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis de barrido con alanina o modelización. Las dianas suelen ser, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

30 En ciertas realizaciones, se pueden producir sustituciones, inserciones o eliminaciones en una o más HVR siempre y cuando dichas modificaciones no reduzcan esencialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar modificaciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservativas conforme a lo dispuesto en el presente documento) que no reduzcan esencialmente la afinidad de unión en la HVR. Dichas modificaciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de las HVR o SDR. En ciertas realizaciones de la variante de las secuencias de VH y VL proporcionadas anteriormente, cada HVR bien no está modificada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

40 Un método útil de identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden ser dianas de la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido con alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. En dicho método, un resto o grupo de restos diana (ejemplo, restos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu), se identifica y se sustituye con un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las posiciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o además, una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos pueden ser la diana o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden explorar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

50 Las inserciones en las secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxi-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de uno o varios restos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima, (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumente la semivida en suero del anticuerpo.

b) Variantes de glicosilación

60 En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es modifica para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo es glicosilado. La adición o eliminación de sitios de glicosilación en un anticuerpo de puede realizar convenientemente modificando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o se eliminen uno o más sitios de glicosilación.

65 Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede modificar el hidrato de carbono unido a la misma. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero normalmente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico, que, en general, está unido por un enlace en N con Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por

ejemplo, Wright *et al.*, *TIBTECH* 15: 26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad media de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa), medida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina situado en torno a la posición 297 de la región Fc (numeración Eu de restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ser situado en torno a ± 3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de la secuencia de menor importancia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una mejor función de ADCC. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); documento US 2004/0093621 (Kyowa Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con las variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: documento US 2003/0157108; documento WO 2000/61739; documento WO 2001/29246; documento US 2003/0115614; documento US 2002/0164328; documento US 2004/0093621; documento US 2004/0132140; documento US 2004/0110704; documento US 2004/0110282; documento US 2004/0109865; documento WO 2003/085119; documento WO 2003/084570; documento WO 2005/035586; documento WO 2005/035778; documento WO2005/053742; documento WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec3 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares desactivadas, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO desactivadas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

También se proporcionan variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está biseccionado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener reducción de la fucosilación y/o mejora de la función ADCC. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al*); Patente de EE.UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una mejora de la función CDC. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); patente de EE.UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*).

c) Variantes de la región Fc

En ciertas realizaciones, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que comprende una modificación de aminoácidos, (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que la convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, siendo, sin embargo, ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de la unión a Fc γ R (por lo tanto, que carezca probablemente de actividad de ADCC), pero que conserve la capacidad de unión a Fc γ Rn. Las células primarias para mediar DAC, las células, NK, solo expresan Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, en la página 464, de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 83: 7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 82:1499-1502 (1985); documento 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al., J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Como alternativa, se pueden emplear métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa,

o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo con animales tal como el descrito en Clynes *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por lo tanto, que carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión de C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. *et al., Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M. S. y M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden determinar la unión a FcRn y la eliminación *in vivo*/semivida usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova S. B. *et al., Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con la función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE.UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los restos 265 y 297 a alanina (patente de EE.UU. n.º 7.332.581).

Se han descrito ciertas variantes de anticuerpos con una mayor o menor unión a FcR. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312, y Shields *et al., J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración de UE de los restos).

En algunas realizaciones, se realizan modificaciones en la región Fc que dan lugar a la modificación (es decir, mejora o reducción) de la unión a C1q y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 y Idusogie *et al. J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

En el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*), se describen anticuerpos con mayor semivida y mejor unión al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al., J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al., J. Immunol.* 24: 249 (1994)). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del resto 434 de la región Fc (patente de EE.UU. n.º 7.371.826).

Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); patente de EE.UU. n.º 5.648.260; patente de EE.UU. n.º 5.624.821; y documento WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpos diseñadas con cisteína

En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos diseñados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se han sustituido con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. De este modo, mediante la sustitución de aquellos restos con cisteína, se colocan grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo, y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otras fracciones tales como fracciones de fármaco o fracciones de enlazador-fármaco, para crear un inmunoconjugado, tal como se describe más a fondo en el presente documento. En ciertas realizaciones, se pueden sustituir uno o más de los siguientes restos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de UE) de la cadena pesada; y S400 (numeración de UE) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos diseñados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar más para que contenga fracciones no proteicas adicionales que se conocen en la técnica y que se pueden obtener fácilmente. Las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil-pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si hay más de un polímero unido, pueden ser moléculas iguales o

diferentes. En general, el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se vayan a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

5 En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y una fracción no proteica que se pueden calentar de forma selectiva mediante la exposición a radiación. En una realización, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 102:11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan la fracción no proteica hasta una temperatura a la que se matan las células próximas a la fracción no proteica del anticuerpo.

B. Métodos recombinantes y composiciones

15 Los anticuerpos se pueden producir usando métodos recombinantes y composiciones, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.816.567. En una realización, se proporciona ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-BACE1 descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo; o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método de fabricación de un anticuerpo anti-BACE1, método que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se ha descrito anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o del medio de cultivo de la célula hospedadora).

35 Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-BACE1, se aísla ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico se puede aislar fácilmente y secuenciar usando procedimientos convencionales, (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

40 Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, "Methods in Molecular Biology", Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pág. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*.) Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar más a fondo.

50 Además de los procariotas, los microbios eucariotas como los hongos filamentosos o las levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican el anticuerpo, incluyendo cepas de hongos y de levaduras cuyas vías de glicosilación se han "humanizado", dando lugar a la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

55 Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar en combinación con células de insectos, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

60 También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como hospedadores. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología de PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

65 También se pueden usar células de vertebrados como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamíferos que se han adaptado a crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón

embrionario humano (293 o células 293 como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J. Gen Virol* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 según lo descrito, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células humanas de carcinoma de cuello uterino (HeLa); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como las descritas, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, "Methods in Molecular Biology", Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pág. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-BACE1 proporcionados en el presente documento se pueden identificar, examinar para o caracterizar por sus propiedades físico/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, se ensayó un anticuerpo de la invención para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos tales como ELISA, transferencia Western, etc.

En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos o Fab descritos en el presente documento, por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10 para la unión a BACE1. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo competitivo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que es unido por cualquiera de los anticuerpos o Fab descritos en el presente documento, por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10. En Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols" en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ), se proporcionan métodos ilustrativos detallados para la cartografía de un epítipo al que se une un anticuerpo.

En un ensayo de competición ilustrativo, se incubó BACE1 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a BACE1 (por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10) y un segundo anticuerpo no marcado que se está ensayando para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo para la unión a BACE1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubó BACE1 inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a BACE1, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con BACE1 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con BACE1 inmovilizado se reduce esencialmente en la muestra de ensayo con respecto a la muestra de control, entonces indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a BACE1. Véase Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", capítulo 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de los anticuerpos anti-BACE1 del mismo que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la inhibición o reducción de la actividad de la aspartil proteasa de BACE1; o la inhibición o reducción de la escisión de APP por BACE1; o la inhibición o reducción de la producción A β . También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se ensaya para determinar dicha actividad biológica. Por ejemplo, la actividad proteasa de BACE1 se puede ensayar en un ensayo HTRF de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo o un ensayo electroforético capilar microfluídico (MCE), como se describe en detalle en el Ejemplo 1 y 2(B), usando péptidos sustrato sintéticos.

En resumen, ensayo de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) se puede usar para medir la actividad aspartil proteasa de BACE1 con el uso de un péptido de escisión de la proteína precursora amiloide BACE1. Por ejemplo, se combina el péptido Bi27 (Biotina-KTEEISEVNLDAEFRHDSGYEVHHQKL (SEQ ID NO: 53), American Peptide Company) con BACE1 previamente incubadas con un anticuerpo anti-BACE en tampón de reacción con BACE (acetato de sodio 50 mM, pH 4,4 y CHAPS al 0,1 %) en una placa de 384 pocillos (Proxiplate™, Perkin-Elmer). Se incubó la mezcla de reacción proteolítica a temperatura ambiente durante 75 minutos y se inactivó mediante la adición de 5 μ l de mezcla de detección de HTRF que contiene estreptavidina-D2 2 nM y 150 nM de un anticuerpo anti-amiloide-beta marcado con criptato de europio en tampón de detección (Tris 200 mM, pH 8,0, EDTA

20 mM, BSA al 0,1 % y KF 0,8 M). Se incuba la mezcla de reacción final a temperatura ambiente durante 60 minutos y se mide la señal de TR-FRET usando un lector de placas EnVision Multilabel Plate Reader™ (Perkin-Elmer) a una longitud de onda de excitación de 320 nm y longitudes de onda de emisión de 615 y 665 nm.

Se puede llevar a cabo una reacción de ensayo MCE en una reacción enzimática convencional, iniciada mediante la adición de sustrato a la enzima y 4 x compuesto, que contiene BACE1 humana (dominio extracelular), el péptido de sitio activo de la proteína precursora amiloide beta-secretasa (FAM-KTEEISEVNLDAEFRWKK-CONH₂ (SEQ ID NO:55), NaOAc 50 mM, pH 4,4 y CHAPS al 0,1 %. Después de la incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente, se separan el producto y el sustrato de cada reacción usando una microplaca microfluidica 12-Sipper analizada en un LC3000® (ambos, Caliper Life Sciences). La separación del producto y el sustrato se optimiza mediante la selección de las tensiones y la presión usando el software de optimización del fabricante. Se calcula la conversión del sustrato desde el electroforegrama usando el software Well Analyzer HTS (Caliper Life Sciences).

Además, la actividad proteasa de BACE1 se puede ensayar *in vivo* en líneas celulares que expresan sustratos de BACE1 tales como APP, o en ratones transgénicos que expresan sustratos de BACE1, tales como APP humana, como se describe en los Ejemplos 2(C) y 4.

Además, la actividad proteasa de BACE1 se puede ensayar con anticuerpos anti-BACE1 en modelos animales. Por ejemplo, en la técnica, se puede disponer fácilmente de modelos animales de diversas enfermedades y trastornos neurológicos, y técnicas asociadas para examinar los procesos patológicos asociados con estos modelos. Los modelos animales de diversos trastornos neurológicos incluyen animales tanto no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Los modelos de animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos murinos. Dichos modelos se pueden generar mediante la introducción de células en ratones singénicos usando técnicas convencionales, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implantación de bazo, implantación intraperitoneal e implantación bajo la cápsula renal. Los modelos *in vivo* incluyen modelos de apoplejía/isquemia cerebral, modelos *in vivo* de enfermedades neurodegenerativas, tales como modelos de ratón de la enfermedad de Parkinson; modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer; modelos de ratón de la esclerosis lateral amiotrófica; modelos de ratón de la atrofia muscular espinal; modelos de ratón/rata de isquemia focal y cerebral global, por ejemplo, modelos de oclusión de la arteria carótida común o de oclusión de la arteria cerebral media; o en cultivos *ex vivo* de embriones enteros. Como ejemplo no limitante, hay una serie de modelos de ratón conocidos en la técnica para la enfermedad de Alzheimer ((véase, por ejemplo, Rakover *et al.*, *Neurodegener. Dis.* (2007); 4(5): 392-402; Mouri *et al.*, *FASEB J.* julio de (2007); 21 (9): 2135-48; Minkeviciene *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Noviembre de (2004); 311 (2):677-82 y Yuede *et al.*, *Behav Pharmacol.* Septiembre de (2007); 18 (5-6): 347-63). Los diversos ensayos pueden realizarse en formatos de ensayo conocidos, *in vitro* o *in vivo*, como se conocen en la técnica y se describen en la literatura. Varios de dichos modelos animales también están disponibles en proveedores comerciales tales como el Laboratorio Jackson. Otros ensayos de modelos animales adicionales se describen en los Ejemplos 4 y 5.

D. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-BACE1 del presente documento conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteínas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o isótopos radiactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitación, un maitansinoide (véase las patentes de EE.UU. n.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como fracciones de fármaco de monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298.); un dolastatina; una caliqueamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.712.374; 5.714.586; 5.739.116; 5.767.285; 5.770.701; 5.770.710; 5.773.001 y 5.877.296; Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:829-834 (2000); Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King *et al.*, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y la patente de EE.UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como el descrito en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitación, la cadena A de la difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

- En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como el descrito en el presente documento conjugado a un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Hay una variedad de isótopos radiactivos disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, Tc99m o I123, o un marcador de espín para la formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.
- Los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil-adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil-suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilenti-aminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Se puede usar, por ejemplo, un enlazador lábil en medio ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro hari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. n.º 5.208.020).
- Los inmunoconjugados o ADC del presente documento contemplan expresamente, pero sin limitación, dichos conjugados preparados con reactivos de entrecruzamiento, incluyendo, pero sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.).
- E. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección
- En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-BACE1 proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de BACE1 en una muestra biológica. El término "detectar", como se usa en el presente documento, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido, tal como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucus, fluido cefalorraquídeo, líquido linfático, tejido neuronal, tejido cerebral, tejido cardíaco o tejido vascular.
- En un aspecto, se desvela un anticuerpo anti-BACE1 para su uso en un método de diagnóstico o detección.
- En un aspecto adicional, se desvela un método de detección de la presencia de BACE1 en una muestra biológica.
- En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-BACE1 como el que se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-BACE1 a BACE1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-BACE1 y BACE1. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se usa un anticuerpo anti-BACE1 para seleccionar los sujetos idóneos para la terapia con un anticuerpo anti-BACE1, por ejemplo, en la que BACE1 es un biomarcador para la selección de los pacientes.
- Los trastornos ilustrativos que pueden ser diagnosticados usando un anticuerpo de la invención incluyen enfermedades neurodegenerativas (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome de postpoliomielitis, síndrome de Shy-Draeger, atrofia olivopontocerebral, enfermedad de Parkinson, atrofia sistémica múltiple, degeneración estriatonigral, tauopatías (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), las enfermedades de priones (incluyendo, pero sin limitación, encefalopatía espongiiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, caquexia crónica e insomnio fatal familiar), apoplejía, distrofia muscular, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, síndrome de Paget, lesión cerebral traumática, parálisis bulbar, enfermedad de la neurona motora y trastornos heterodegenerativos del sistema nervioso (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis ceroides neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del cabello ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden-Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Unverricht-Lundborg), demencia (incluyendo, pero sin limitación, la enfermedad de Pick y ataxia espinocerebelosa).
- En ciertos aspectos, se desvelan anticuerpos anti-BACE1 marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o fracciones que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como fracciones tales como enzimas o ligandos, que se

detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE.UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-BACE1 como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 6ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. En general, los vehículos farmacéuticamente aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitación: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico; parabenos de alquilo tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de proteínas-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables del presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticial tales como glicoproteínas de hialuronidasa solubles neutras-activas (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertos sHASEGP ilustrativos y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con uno o más glicosaminoglicanasas tales como condroitinasas.

En la patente de EE.UU. n.º 6.267.958, se describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas ilustrativas. Las formulaciones acuosas de anticuerpos incluyen las descritas en la patente de EE.UU. n.º 6.171.586 y WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación del presente documento también puede contener más de un principio activo que sea necesario para la indicación en particular que se esté tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Dichos principios activos están presentes adecuadamente combinados en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

En general, las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son estériles. La esterilidad se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos terapéuticos y composiciones

Cualquiera de los anticuerpos anti-BACE1 proporcionados en el presente documento puede usarse en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-BACE1 para su uso como un medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-BACE1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno neurológico (por ejemplo, EA). En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-BACE1 para su uso en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-BACE1 para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno neurológico que

comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-BACE1. En una de dichas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un anticuerpo anti-BACE1 para su uso en la reducción o inhibición de la formación de placa amiloide en un paciente en riesgo de padecer o que padece una enfermedad o un trastorno neurológico (por ejemplo, EA). En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-BACE1 para su uso en un método de reducción o inhibición de la producción de A β en un individuo que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-BACE1. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es preferentemente un ser humano. En cierto aspecto, el anticuerpo anti-BACE1 para su uso en los métodos de la invención reduce o inhibe la actividad de BACE1. Por ejemplo, el anticuerpo anti-BACE1 reduce o inhibe la capacidad de BACE1 para escindir APP.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-BACE1 en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno neurológico. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno neurológico que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad o el trastorno neurológico una cantidad eficaz del medicamento. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración al individuo de una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como los que se describen a continuación. En una realización adicional, el medicamento es para inhibir la actividad de BACE1. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método de inhibición de la producción de A β o la formación de placa en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inhibir la producción de A β o la formación de placa. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene EA una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-BACE1. En una de dichas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-BACE1 proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-BACE1 proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-BACE1 proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como los que se describen a continuación.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede administrar de manera concomitante con al menos un agente terapéutico adicional.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede tener lugar antes de, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en combinación con radioterapia.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrado mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por medio de inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica. En el presente documento, se contemplan diversas pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitación, administraciones individuales o múltiples, en varios puntos temporales, administración en bolo y la infusión de pulsos.

Ciertas realizaciones de la invención proporcionan el anticuerpo o fragmento del mismo para que atraviese la barrera hematoencefálica. Ciertas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de manera que el anticuerpo o fragmento activo del mismo se pueden introducir fácilmente en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varios enfoques conocidos en la técnica para el transporte de moléculas a través de ella, incluyendo, pero sin limitación, métodos físicos, métodos basados en lípidos, y métodos a base de receptores y canales.

Los métodos físicos de transporte del anticuerpo o fragmento del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, evitar la barrera hematoencefálica en su totalidad o mediante la creación de aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de evitación incluyen, pero sin limitación, la inyección directa en el

cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)) y la implantación de un dispositivo de administración en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos de creación de aberturas en la barrera incluyen, pero sin limitación, ecografía (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º 2002/0038086), la presión osmótica (por ejemplo, mediante la administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., "Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation", Vol 1 y 2, Plenum Press, N. Y. (1989))), la permeabilización mediante, por ejemplo, bradiquinina o permeabilizador A-7 (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 y 5.686.416) y transfección de las neuronas que se sitúan en la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o fragmento del mismo (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar un anticuerpo o fragmento del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, encapsular el anticuerpo o fragmento del mismo en liposomas que se acoplan con fragmentos de unión al anticuerpo que se unen con receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20020025313), y recubrir el anticuerpo o fragmento del mismo en partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040131692).

Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores para considerar en el presente contexto incluyen el trastorno que se trate en particular, el mamífero que se trate en particular, la afección clínica de cada paciente, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. Aunque no es necesario, el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes que se usen en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, a las mismas dosis y por las vías de administración descritas en el presente documento, o del aproximadamente 1 al 99 % de las dosis descritas en el presente documento, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine de forma empírica/clínica que sea apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales distintos) dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico a cargo. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, de 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, bien, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ilustrativa del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de mayor carga inicial, seguida de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-BACE1.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto, se desvela un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente.

El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o cuando se combina con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección, y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección seleccionada. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a)

un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico u otro agente terapéutico adicional. El artículo de fabricación del presente aspecto de la divulgación puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una determinada afección. Como alternativa, o además, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos anteriores de fabricación puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-BACE1.

III. Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que otras diversas realizaciones pueden ponerse en práctica, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

EJEMPLO 1: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-BACE1

Se generaron anticuerpos que se unen específicamente a BACE1 mediante la selección de dos tipos diferentes de bibliotecas de anticuerpos de presentación en fagos (una con diversidad natural (VH y VH/VL), la otra con diversidad en ciertas regiones CDR restringidas artificialmente a determinados conjuntos de aminoácidos (YSGX)) contra el dominio extracelular de BACE1 humana, aminoácidos 1-457 de SEQ ID NO: 49.

A. Clasificación y exploración de la biblioteca de diversidad natural para identificar anticuerpos anti-BACE-1

Selección de clones anti-BACE1 presentados en fagos

Se usó como antígeno para la clasificación de la biblioteca BACE-1 humana biotinilada (1-457 de SEQ ID NO: 49). Las bibliotecas de fagos de diversidad natural se clasificaron cinco series contra BACE-1 biotinilada previamente capturada en placas de neutravidina/estreptavidina alternas. Para la primera serie de clasificación, primero se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos NUNC con 10 µg/ml de neutravidina (Fisher Scientific, n.º 21125) y se bloquearon con tampón PBST de bloqueo de fagos (solución salina tamponada con fosfato (PBS) y albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % (p/v) y Tween 20 al 0,05 % (v/v)) durante la noche. En primer lugar, se capturaron 10 µg/ml de BACE-1 biotinilada en las inmunoplasmas durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron las bibliotecas de fagos de anticuerpos VH (véase por ejemplo, Lee *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 284:119-132 (2004)) y VH/VL (véase Liang *et al.*, *J. Mol. Biol.* 366:815-829 (2007)), previamente bloqueadas con tampón PBST tampón de bloqueo de fagos, a las placas y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavaron las placas 10 veces con PBT (PBS con Tween 20 al 0,05 %), y se eluyeron los fagos unidos con 1 ml de HCl 50 mM y NaCl 500 mM durante 30 min, y se neutralizaron con 600 µl de base Tris 1 M (pH 8,0). Se amplificaron los fagos recuperados en células XL-1 Blue de *E. coli*. Durante las siguientes series de selección, las bibliotecas de fagos propagadas se absorbieron previamente primero con 50 µl de estreptavidina T1 Dynabeads®MyOne™ (Invitrogen, n.º 65601) en PBST/BSA y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se sustrajeron las partículas de fago unidas a la neutravidina de la reserva de fagos con la eliminación de las Dynabeads®. A continuación, se añadieron los fagos no unidos a antígeno BACE-1 presentado en las placas de estreptavidina y se redujo el tiempo de incubación a 2-3 horas. Se fue aumentando gradualmente la rigurosidad del lavado de las placas.

Tras 5 series de selección, se observó un enriquecimiento significativo. Se escogieron 96 clones de la clasificación de biblioteca VH y VH/VL para determinar si se unían específicamente a BACE-1 humana. Se secuenciaron por PCR las regiones variables de estos clones para identificar los clones de secuencia única. Se escogieron 42 anticuerpos de fagos únicos que se unían a BACE-1 humana al menos 5 veces por encima del fondo y se reformatearon hasta IgG de longitud completa para la evaluación en ensayos de células *in vitro*.

Los clones de interés se reformatearon en IgG mediante la clonación de las regiones V_L y V_H de los clones individuales en los vectores LPG3 y LPG4, respectivamente, y se expresaron transitoriamente en células CHO de mamífero, y se purificaron usando cromatografía de la columna de proteína A.

Selección de clones inhibidores de anti-BACE1

BACE1 es una aspartil proteasa que normalmente escinde la proteína precursora amiloide en un punto cerca de su dominio transmembrana, cerca de la superficie de la célula. Por consiguiente, se evaluó *in vitro* la capacidad de los anticuerpos identificados anteriormente para modular la actividad proteolítica de BACE1 en ciertos sustratos de BACE1, usando un ensayo de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF).

El ensayo de HTRF se realizó de la siguiente manera. Se combinaron dos microlitros de Bi27 375 nM (Biotina-KTEEISEVNLDAEFRH-DSGYEVHHQKL (SEQ ID NO:53), American Peptide Company), un péptido sitio de escisión de BACE1 de la proteína precursora amiloide que porta una sustitución para aumentar la sensibilidad a la escisión de BACE1, con 3 μ l de BACE1 125 nM previamente incubada con un anticuerpo anti-BACE en tampón de reacción con BACE (acetato de sodio 50 mM, pH 4,4 y CHAPS al 0,1 %) en una placa de 384 pocillos (Proxiplate™, Perkin-Elmer). Se incubó la mezcla de reacción proteolítica a temperatura ambiente durante 75 minutos y se inactivó mediante la adición de 5 μ l de mezcla de detección de HTRF que contenía estreptavidina-D2 2 nM y anticuerpo anti-amiloide-beta 6E10 150 nM (Covance, Emoryville, CA) marcado con criptato de europio en tampón de detección (Tris 200 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, BSA al 0,1 % y KF 0,8 M). Se incubó la mezcla de reacción final a temperatura ambiente durante 60 minutos, y se midió la señal de TR-FRET usando un lector de placas EnVision Multilabel Plate Reader™ (Perkin-Elmer) a una longitud de onda de excitación de 320 nm y longitudes de onda de emisión de 615 y 665 nm. Las reacciones que carecían de la enzima BACE1 (0 BACE) y las reacciones que contenían anticuerpos anti-BACE1 (PBS (100 % de actividad de BACE1) se usaron como controles.

De los 42 anticuerpos ensayados que se identificaron de la biblioteca de diversidad natural, se escogió el mejor inhibidor de BACE1, YW412.8, para la maduración de afinidad. Véase la Figura 4.

Maduración de afinidad de clones inhibidores de anticuerpos anti-BACE1

Se construyeron bibliotecas para madurar la afinidad del anticuerpo YW412.8 de la siguiente manera. El fagémido pW0703 (derivado del fagémido pV0350-2b (Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340, 1073-1093 (2004)), que contiene un codón de parada (TAA) en todas las posiciones de CDR-L3 y presenta Fab monovalente en la superficie del bacteriófago M1 3) sirvió como molde de la biblioteca para injertar los dominios variables de cadena pesada (VH) de los clones de interés de la biblioteca de diversidad natural para la maduración de afinidad. Para la maduración de afinidad, se usaron estrategias de aleatorización en condiciones tanto rigurosas como suaves. Para la aleatorización en condiciones rigurosas, se aleatorizó una biblioteca de cadenas ligeras con posiciones seleccionadas de las tres CDR de cadena ligera, usando aminoácidos diseñados para imitar a los anticuerpos humanos naturales, y la degeneración diseñada del ADN fue como se describe en Lee *et al.* (*J. Mol. Biol.* 340,1073-1093 (2004)). Para la aleatorización en condiciones suaves, las dianas fueron los restos en las posiciones 91-94 y 96 de CDR-L3, 28-31 y 34-35 de CDR-H1, 50, 52 y 53-58 de CDR-H2, 95-99 y 100A de CDR-H3; y se seleccionaron dos combinaciones diferentes de bucles de CDR, L3/H1/H2 y L3/H3, para la aleatorización. Para conseguir las condiciones de aleatorización suaves, que introdujeron la tasa de mutación del aproximadamente 50 % en las posiciones seleccionadas, el ADN mutagénico se sintetizó con 70-10-10-10 mezclas de bases que favorecen los nucleótidos de tipo silvestre (Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:1233-1251 (1994)).

La selección de los Fab con afinidad mejorada se realizó de la siguiente manera. Se sometieron bibliotecas de fagos de afinidad mejorada a la clasificación de placas para la primera serie, seguida de cuatro o cinco series de clasificación de la solución. Para la primera serie de clasificación de la placa, las bibliotecas se clasificaron frente a 10 μ g/ml de diana biotinilada (BACE1) capturada por una placa recubierta de neutravidina (placa Maxisorp de NUNC) con la entrada del fago aproximadamente 2 DO/ml en BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la primera serie de clasificación de la placa, se realizó la clasificación de la solución para aumentar la rigurosidad de la selección. Para la clasificación de la solución, se incubó 1 DO/ml de fago propagado a partir de la primera serie de clasificación de la placa con proteína diana biotinilada 100 nM (la concentración se basó en los valores de Cl_{50} del fago del clon parental) en 100 μ l de tampón que contenía Superblock al 1 % (Pierce Biotechnology) y Tween 20 al 0,05 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla adicionalmente con 10 x Superblock al 1 %, y se aplicaron 100 μ l/pocillo a pocillos recubiertos con neutravidina (5 μ g/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave de manera que la diana biotinilada se uniera al fago. Se lavaron los pocillos con PBS y Tween 20 al 0,05 % diez veces. Para determinar la unión de fondo, se capturaron los pocillos de control que contenían el fago con dianas que no se biotinilaron en placas recubiertas de neutravidina. Los fagos unidos se eluyeron con HCl 0,1 N durante 20 minutos, se neutralizaron mediante una décima parte del volumen de Tris 1 M, pH 11, se valoraron y se propagaron para la siguiente serie. A continuación, se llevaron a cabo dos series más de clasificación de solución en conjunto con rigurosidad de selección creciente. La primera serie fue para la selección de la velocidad de asociación mediante la reducción de la concentración de proteína diana biotinilada de 100 nM a 5 nM. La segunda serie fue para la selección de la velocidad de disociación mediante la adición de cantidades en exceso de proteína diana no biotinilada (100 veces más) para competir con aglutinantes más débiles a temperatura ambiente. Además, la entrada del fago se redujo (0,1~ 0,5 DO/ml) hasta una unión del fago de fondo inferior.

Se escogieron colonias de las exploraciones de la cuarta serie y se cultivaron durante la noche a 37 °C en 150 μ l/pocillo de medio 2YT con 50 μ g/ml de carbenicilina y 1 x 10¹⁰/ml de fago K07 en placas de 96 pocillos (Falcon). De la misma placa, se escogió una colonia de fago parental infectado por XL-1 como control. Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorp de Nunc con 100 μ l/pocillo neutravidina (2 μ g/ml) en PBS a 4 °C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Se bloquearon las placas con 65 μ l de BSA al 1 % durante 30 min y 40 μ l de Tween 20 al 1 % durante otros 30 minutos antes de añadirse la proteína diana biotinilada (2 μ g/ml) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

Se diluyó el sobrenadante de fagos a 1:10 en tampón de ELISA (ensayo inmunoenzimático ligado a una enzima) (PBS con BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,05 %) con o sin proteína diana 10 nM en un volumen total de 100 µl y se incubó durante al menos 1 hora a temperatura ambiente en una placa de F (NUNC) para su uso en un ensayo de competición de un solo punto. Se transfirieron 75 µl de mezcla con o sin proteína diana a cada lado de la proteína diana capturada por placas recubiertas de neutravidina. Se agitó la placa suavemente durante 15 min para permitir la captura del fago no unido a la proteína diana capturada con neutravidina. Se lavó la placa al menos cinco veces con PBS-Tween 20 al 0,05 %. Se cuantificó la unión mediante la adición de anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón de ELISA (1:5000) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0,05 % al menos cinco veces. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y Solución de peroxidasa B (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) al pocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la DO (densidad óptica) del color amarillo en cada pocillo usando un lector de placas de ELISA convencional a 450 nm. Se calculó la reducción de la DO (%) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Reducción DO}_{450\text{nm}} (\%) = [(\text{DO}_{450\text{nm}} \text{ de pocillo con competidor})/(\text{DO}_{450\text{nm}} \text{ de pocillos sin competidor})] \times 100.$$

En comparación con la reducción de DO_{450nm} (%) del pocillo de fago parental (100 %), se escogieron los clones que tenían la reducción de DO_{450nm} (%) inferior al 50 % tanto para la diana humana como para la murina para el análisis de secuencias. Se seleccionaron los clones únicos para la preparación de los fagos para determinar la afinidad de unión (Cl₅₀ de los fagos) frente a la diana en comparación con los clones parentales. Los clones de afinidad más mejorada se reformatearon en IgG1 humana para la producción de anticuerpos y análisis cinéticos de unión adicionales por resonancia de plasmón superficial usando BIAcore y otros ensayos *in vitro* o *in vivo*.

En las Figuras 1(A) y 1(B), se muestra la secuencia de la región HVR de cadena ligera y de cadena pesada de YW412.8, seleccionado de la biblioteca de fagos de diversidad natural. Además, también se secuenciaron cinco anticuerpos obtenidos a partir de la maduración de afinidad del anticuerpo YW412.8, y las secuencias de HVR de cadena ligera y de cadena pesada se muestran también en las Figuras 1(A) y 1(B). Las secuencias de aminoácidos consenso de las regiones HVR de cadena ligera que mostraron variabilidad en estos anticuerpos fueron: HVR-L1: Arg Ala Ser Gln X₁ Val X₂ X₃ X₄ X₅ Ala (SEQ ID NO: 17), en la que X₁ se selecciona entre ácido aspártico y valina, X₂ se selecciona entre serina y alanina, X₃ se selecciona entre treonina y asparagina, X₄ se selecciona entre alanina y serina, y X₅ se selecciona entre valina y leucina; HVR-L2: X₆ Ala Ser Phe Leu Tyr Ser (SEQ ID NO: 18), en la que X₆ se selecciona entre serina y leucina; y HVR-L3: Gln Gln X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ Thr (SEQ ID NO: 19), en la que X₇ se selecciona entre serina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico y tirosina, X₈ se selecciona entre tirosina, prolina, serina y alanina, X₉ se selecciona entre treonina y asparagina, X₁₀ se selecciona entre treonina, tirosina, ácido aspártico y serina, X₁₁ se selecciona entre prolina y leucina y X₁₂ se selecciona entre prolina y treonina. Solo la región hipervariable de cadena pesada H1 presentó variabilidad entre estos anticuerpos, y la secuencia consenso para esa región fue: HVR-H1: Gly Phe Thr Phe X₁₃ Gly Tyr X₁₄ Ile His (SEQ ID NO: 26), en la que X₁₃ se selecciona entre serina y leucina, y X₁₄ se selecciona entre alanina y glicina.

B. Clasificación y exploración de la biblioteca de diversidad sintética para identificar anticuerpos anti-BACE-1

Se han construido bibliotecas de anticuerpos sintéticas minimalistas con diversidad química restringida en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y se ha demostrado su eficacia en la obtención de aglutinantes de anticuerpos de alta afinidad contra una variedad de proteínas como se ha descrito anteriormente en Fellouse, F. A. *et al. J. Mol. Biol.* 373:924-940 (2007). Se usó una biblioteca de diversidad sintética, designada biblioteca YSGX, para buscar un anticuerpo inhibidor contra BACE1 mediante clasificación de solución. La selección para la unión se llevó a cabo durante cinco series como se describe a continuación.

La biblioteca para la clasificación primaria, designada biblioteca YSGX, se construyó como se ha descrito anteriormente usando un fagémido para la presentación en fagos de Fab (pF1359) (Biblioteca D en Fellouse, F. A. *et al., J. Mol. Biol.* 373:924-940 (2007)). La diversidad de la biblioteca era de aproximadamente 2×10^{10} .

Para la maduración de afinidad, se aleatorizaron las tres CDRL con CDRH fijo para los clones seleccionados derivados de la clasificación primaria. Se usaron tres tipos de oligonucleótidos para la aleatorización. El tipo I usa el codón degenerado TMC que solo codifica Tyr y Ser. El tipo II usa una mezcla de fosforamidita trímera personalizada que contiene codones para Tyr, Ser, Gly y Trp en relaciones equimolares. El tipo III usa una mezcla de fosforamidita trímera que codifica 10 restos de aminoácidos en las siguientes relaciones molares: Tyr (30 %), Ser (15 %), Gly (15 %), Trp (10 %) y Phe, Leu, His, Asp, Pro, Ala, u 5 % de cada uno. Se introdujo una mutación en los oligonucleótidos usados para CDR-L3 de manera que el sitio *KpnI* del molde original se silenciara tras la mutagénesis. La variación de la longitud fue de 3 a 10 aminoácidos para CDR-L1, de 7 aminoácidos para CDR-L2 y de 2-10 aminoácidos para CDR-L3. Los oligonucleótidos se combinaron entre sí de manera adecuada para preparar el conjunto final de oligonucleótidos, es decir, la mezcla de todos los oligonucleótidos L1, L2 y L3 con diferente longitud dentro de un tipo y luego la mezcla de los tres tipos entre sí como el conjunto de oligonucleótidos para CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, respectivamente. Se usó la mutagénesis de Kunkel para reemplazar todas las posiciones de

CDR-LC. Tras la mutagénesis de Kunkel (Kunkel, T. A. *et al. Methods Enzymol* 154: 367-382 (1987)), se purificó el ADN y se trató con *KpnI* a 37 °C durante 3 h para digerir el molde de ADN. A continuación, se sometió el ADN purificado a electroporación para la construcción de la biblioteca.

5 Selección de clones anti-BACE1 presentados en fagos

Se usó BACE-1 humana biotinilada (1-457 de SEQ ID NO: 49) como antígeno para la clasificación de la biblioteca. Para la primera serie de selección, se incubaron 20 µg de BACE1 biotinilada con 1 ml de la biblioteca a una concentración de 1×10^{13} ufp/ml a 4 °C durante 1,5 h. Se capturaron los fagos unidos a la diana durante 15 minutos con 200 µl de estreptavidina Dynabeads® MyOne que se había bloqueado previamente con tampón de bloqueo (PBS, albúmina de suero bovino al 0,5 % (p/v)). Se eluyeron los fagos unidos con HCl 0,1 M y se neutralizaron inmediatamente con base Tris 1 M. Se amplificaron los fagos eluidos siguiendo el protocolo convencional que se ha descrito anteriormente (Sidhu, S. S. *et al. Methods Enzymol.* 328:333-363 (2000)). La segunda serie se llevó a cabo la misma que la primera serie usando 10 µg de BACE1 biotinilada incubada con 400 µl de fago amplificado. Para todas las series posteriores, se incubaron 2 µg BACE1 biotinilada con 400 µl de fagos amplificados. Se capturaron los fagos que se unieron a BACE1 biotinilada durante 15 min usando inmunoplasmas Maxisorp (NUNC) que se habían recubierto previamente con neutravidina o estreptavidina (alternativamente entre las series) y se bloquearon con tampón de bloqueo.

Tras cinco series de selección, se produjeron fagos a partir de clones individuales cultivados en un formato de 96 pocillos y se diluyeron los sobrenadantes del cultivo tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS), albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 % (p/v) (Sigma - Aldrich, St Louis, MO), Tween 20 al 0,1 % (v/v) (Sigma-Aldrich) (tampón PBT) para su uso en un ELISA de manchas de fago. Se incubaron los sobrenadantes de fagos diluidos durante 1 h con BACE1 biotinilada que se inmovilizó sobre inmunoplasmas Maxisorp de 384 pocillos recubiertas con neutravidina (NUNC). Las placas se lavaron seis veces con PBS, Tween 20 al 0,05 % (v/v) (tampón PT) y se incubaron durante 30 min con conjugado de peroxidasa de rábano picante/anticuerpo anti-M13 (dilución a 1:5.000 en tampón PBT) (GE Healthcare). Se lavaron las placas seis veces con tampón PT, y dos veces con PBS, se revelaron durante 15 min con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina/peroxidasa de H₂O₂ (Kirkegaard Perry-Laboratories), se inactivaron con H₃PO₄ 1,0 M y se leyó la absorbancia espectrofotométricamente a 450 nm.

30 Selección de clones inhibidores de anti-BACE1

La selección de la biblioteca YSGX dio lugar a la identificación de 18 clones únicos que se unieron a BACE1. Véase la Figura 3. Las proteínas Fab correspondientes a estos clones se purificaron de la siguiente manera. Se introdujo un codón de parada entre la cadena pesada y el gen 3 en el fagémido codificante de Fab. Se transformó el fagémido resultante a la cepa 34B8 de *E. coli*. Se cultivó una sola colonia durante una noche a 37 °C en 30 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de carbenicilina. Se inoculó el cultivo de una noche (5 ml) en 500 ml de medio C.R.A.P. completo suplementado con carbenicilina (50 µg/ml) y se cultivó a 30 °C durante 24 h. Se purificaron las proteínas Fab usando perlas de agarosa con proteína A mediante métodos convencionales.

Los Fab purificados se seleccionaron para determinar la actividad inhibidora contra BACE1 usando un ensayo de actividad enzimática de HTRF como se ha descrito anteriormente. Se identificaron los Fab 2, 5, 8, 12, 14 y 19 como inhibidores de BACE1 y el Fab 23 se identificó como un activador. Véase la Figura 5.

Se caracterizaron los Fab 2, 5, 8, 12, 14 y 19 adicionalmente para determinar su epítipo de unión. Se usó el grupo de los Fab purificados para que el total de los 6 anticuerpos compitiera con el fago de presentación de Fab unido a BACE1 capturada en la placa en un ELISA de competición de fagos como se describe a continuación.

Se escogieron colonias individuales (en células XL1 Blue) de los clones seleccionados y se cultivaron en 1 ml de caldo 2YT suplementado con 50 µg/ml de carbenicilina, 10 µg/ml de tetraciclina y M13K07 a 37 °C durante 2 h. Se añadió kanamicina (25 µg/ml) al cultivo, que continuó creciendo durante 6 h. Se transfirió el cultivo a 30 ml de caldo 2YT suplementado con 50 µg/ml de carbenicilina y 25 µg/ml de kanamicina, y se cultivaron a 37 °C durante una noche. Se recogieron los fagos y se purificaron como se ha descrito previamente (Sidhu, S. S. *et al. Methods Enzymol.* 328:333-363 (2000)). Se diluyeron los fagos de presentación de Fab purificados en serie en tampón de PBT y se ensayaron para determinar la unión a BACE1 inmovilizada en una placa. Se seleccionó una concentración de fagos fija que dio el 80 % de las señales de saturación para el ELISA de competición posterior. La competición se realizó incubando los fagos de presentación de Fab en subsaturación, fijos, con diluciones en serie de BACE1 durante 1 h, y luego se transfirieron a la placa de BACE1 inmovilizada durante 15 min para capturar el fago no unido. Se lavó la placa durante 8 veces y se detectaron los fagos unidos por anti-M13-HRP.

El Fab 5 purificado resultó ser competitivo con la unión de BACE1 a los Fab 8 y 12 presentados en fagos, pero no a los Fab 2, 14 y 19. Coincidiendo con estos datos, el Fab 8 purificado resultó ser competitivo con los Fab 5 y 12 presentados en fagos. Tomados en conjunto, estos datos indican que los Fab 5, 8 y 12 se unen a los mismos epítipos o epítipos solapados en BACE1. Los Fab 14 y 19 también resultaron ser competitivos entre sí basándose en el hecho de que cualquiera de estos Fab purificados resultó ser competitivo con los fagos de presentación bien

de Fab 14 o de Fab 19. Esto sugiere que estos dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a epítipos solapados, lo que difiere de los de Fab 5, 8 y 12. En el ensayo ELISA de fagos, los fagos de presentación de Fab 2 no fueron superados por ninguna de las proteínas Fab purificadas, incluyendo el propio Fab 2, lo que sugiere que la unión entre Fab 2 y BACE1 era inespecífica. Por lo tanto, se excluyó Fab 2 como candidato para la maduración de afinidad.

Maduración de afinidad de clones inhibidores de anticuerpos anti-BACE1

Para mejorar la afinidad de unión de los anticuerpos inhibidores precursores obtenidos mediante el proceso de selección inicial, se diseñaron nuevas bibliotecas de fagos que aleatorizaron las tres CDR-LC de los Fab 5, 8, 12, 14 y 19. Se dividieron estos cinco anticuerpos en dos subgrupos basados en sus diferentes epítipos - Fab 5, 8 y 12 como grupo 1, y Fab 14 y 19 como grupo 2. Se purificó el ADN monocatenario (ADNmc) para los clones individuales como moldes para la construcción de la biblioteca. Se combinaron entre sí los moldes de ADNmc del grupo 1 para la biblioteca de maduración de afinidad 1 (designada LC-lib1), y el grupo 2 se combinó para la biblioteca 2 (LC-lib2). La diversidad química era limitada dentro de las CDR aleatorizadas basadas en la capacidad funcional de los aminoácidos naturales para el reconocimiento molecular. Véase Birtalan, S. *et al. Mol Biosyst.* 6:1186-1194 (2010). Se mezclaron la diversidad minimalista (codón binario de Tyr y Ser), la diversidad semiminimalista (codón ternario de Tyr, Ser, Gly y Trp) y la diversidad adicional con 10 aminoácidos implicados con el fin de lograr una alta afinidad. Se construyeron dos bibliotecas de maduración de afinidad, LC-lib y LC-lib2, usando el mismo conjunto de grupos de oligonucleótidos para aleatorizar las tres CDR-LC simultáneamente como se ha descrito anteriormente. Para la maduración de afinidad, se aleatorizaron las tres CDR-LC (región determinante de la complementariedad - cadena ligera) con CDR-HC (región determinante de la complementariedad - cadena pesada) fija para los clones seleccionados derivados de la clasificación primaria.

La exploración de las bibliotecas para determinar la maduración de afinidad de los anticuerpos obtenidos inicialmente se llevó a cabo de manera similar a la descrita anteriormente. Las bibliotecas se clasificaron con BACE1 biotinilada en solución de 3 series, lo que produjo un enriquecimiento superior a 100 veces en la unión. Para la serie 1, se incubaron 2 μg de BACE1 con biotina con la biblioteca de Fab presentados en fagos. Para las series 2 y 3, se incubaron BACE1 biotinilada 20 nM y 5 nM con el fago amplificado, respectivamente. Se exploraron los clones (96) de cada una de las dos bibliotecas en un ELISA de competición de un solo punto, en el que se usaron 20 nM de BACE1 en solución para competir con la partícula de fago en la unión a la BACE1 inmovilizada en la placa como se describe a continuación.

Se preparó una placa inmovilizada con BACE1 mediante la captura de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BACE1 biotinilada durante 15 min usando una placa inmunoplate Maxisorp de 384 pocillos que se había recubierto previamente con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de neutravidina a 4 °C durante una noche y bloqueado con tampón de bloqueo. Se diluyeron los sobrenadantes de cultivo de clones individuales cultivados en un formato de 96 pocillos 20 veces en tampón de PBT y se incubaron con o sin BACE1 20 nM a temperatura ambiente durante 1 h. Se transfirió la mezcla a la placa con BACE1 inmovilizada y se incubó durante 15 min. Se lavó la placa seis veces con tampón PT y se detectó el fago unido por anti-M13-HRP como se ha descrito anteriormente. La proporción entre la señal de ELISA del pocillo en ausencia y en presencia de BACE1 en solución indica la afinidad del clon, indicando las proporciones más altas las afinidades más altas.

Cinco clones de LC_lib1 tenían una proporción > 4 entre la señal de ELISA del pocillo en ausencia de BACE1 con respecto a la señal de ELISA del pocillo en presencia de BACE1 y un clon de LC_lib2 con proporción > 3. Dos clones, designados LC4 y 11, se obtuvieron de Fab5; tres clones, LC6, LC9 y LC10, de Fab 12, y LC40 de Fab14 (Figura 6).

Para estimar la afinidad de estos 6 clones, se realizaron ensayos ELISA de competición de fagos, como se ha descrito anteriormente, y se determinaron los valores de CI_{50} (Figura 7). Los valores de CI_{50} se determinaron ajustando los datos a una ecuación logística de cuatro parámetros desarrollada por Marquardt (Marquardt, D. W. *SIAM J. Appl. Math.* 11: 431-441 (1963)), usando el software Kaleidagraph (Synergy Software), y se muestran a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

ID del Fab	CI_{50} nM	Veces de mejora de la afinidad
Fab5*	20,7 \pm 9,5	1
LC4	0,46 \pm 0,07	45
LC11	0,88 \pm 0,14	24
Fab12*	45,3 \pm 31	1
LC9	0,12 \pm 0,02	378

ID del Fab	Cl ₅₀ nM	Veces de mejora de la afinidad
LC10	0,12 ± 0,01	378
LC6	0,12 ± 0,02	156
Fab14*	14,3 ± 2,5	1
LC40	4,7 ± 0,7	3
*precursor		

Todos los clones LC mostraron afinidad mejorada en comparación con sus respectivos precursores. En particular, la introducción de dos restos de Trp en CDR-L2 mejoró la afinidad de los derivados de Fab 12 en más de 100 veces con respecto al precursor

5 Las proteínas Fab de 6 clones se purificaron y se sometieron al ensayo de la actividad enzimática de HTRF, como se ha descrito anteriormente. Como control, se usó OM99-2 (CalBiochem®, n.º de catálogo 496000), un inhibidor peptídico de BACE1. Para los anticuerpos con Fab 5 como precursor, Fab LC 4 mostró una inhibición significativamente mejor, mientras que LC11 perdió su actividad de inhibición. LC 40, derivado de Fab 14, también
10 perdió su actividad de inhibición. Los derivados con afinidad mejorada de Fab 12, Fabs LC 6, LC 9 y LC10, en general, mostraron una mejora de aproximadamente 20 veces en su actividad de inhibición (Figura 8). Basándose en este ensayo, Fab LC 6 resultó ser el mejor inhibidor y mostró una inhibición de casi el 100 % de la actividad enzimática, mientras que otros Fab resultaron ser inhibidores parciales, con un grado de inhibición del aproximadamente 60 al 70 % (Figura 8). Los valores de Cl₅₀ para los diversos Fab ensayados se muestran a
15 continuación en la Tabla 3. La Cl₅₀ de OM99-2 fue de 11 nM en este ensayo.

TABLA 3

ID del FAB	Cl ₅₀ (nM)
Fab5*	130
LC4	480
LC11	n.d.
Fab12*	n.d.
LC9	140
LC10	180
LC6	160
Fab14*	740
LC40	n.d.
*precursor	

20 En las Figuras 2(A) y 2 (B), se muestra secuencia de las regiones HVR de cadena ligera y de cadena pesada de Fab 12. En las Figuras 2(A) y 2 (B), también se muestra la secuencia HVR de cadena ligera y cadena pesada de los tres anticuerpos producidos por maduración de afinidad de Fab 12. Solo HVR-L2 de cadena ligera presentó variabilidad en estos anticuerpos: HVR-L2: X₁₅ Ala Ser X₁₆ Leu Tyr Ser (SEQ ID NO: 41), en la que X₁₅ se selecciona entre serina, triptófano y tirosina, y X₁₆ se selecciona entre serina y triptófano. Cada una de las tres regiones HVR de cadena pesada resultó ser idéntica en los cuatro anticuerpos.

25 Se clonaron los Fab como anticuerpos IgG para su uso en otras aplicaciones de la siguiente manera. Se clonaron los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada de los Fab seleccionados en un plásmido basado en pRK5 con el dominio constante de cadena ligera o cadena pesada humano (IgG1 humana) para la expresión transitoria de IgG en células 293T o células de ovario de hámster chino (CHO). Las proteínas de IgG se purificaron usando perlas
30 de agarosa con proteína A mediante métodos convencionales.

EJEMPLO 2: CARACTERIZACIÓN ADICIONAL DE LOS ANTICUERPOS ANTI-BACE1

35 Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos se identificaron en términos de su función y de la unión al epítipo en BACE1. Los anticuerpos parentales y de afinidad madurada se caracterizaron además usando los ensayos descritos a continuación.

A. Cinética de unión

Se evaluó la cinética de unión de YW412.8.31. En resumen, se midieron las afinidades de unión de las IgG anti-BACE1 por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento BIAcore™ -3000. La IgG humana anti-BACE1 YW412.8.31 fue capturada por el anticuerpo Fc anti-humano de ratón (GE Healthcare, n.º de cat. BR-1008-39) que recubría microplacas con biosensor CM5 para obtener aproximadamente 100 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones de cinética, se inyectaron diluciones en serie con factor de dilución de dos (0,98 nM a 125 nM) de ECD de BACE1 humana o ECD de BACE1 murina (aminoácidos 1-457) en tampón PBT (PBS con Tween 20 al 0,05 %) a 25 °C con un caudal del 30 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo simple de unión de Langmuir de uno a uno (Software de evaluación BIAcore™ versión 3.2). La constante de equilibrio de disociación (K_D) se calculó como el cociente de k_{off}/k_{on} . Los resultados de la unión de YW412.8.31 a pH 7,0 se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4 - Valores de la cinética de unión para los anticuerpos anti-BACE1 medidos por BIAcore™

ANTICUERPO	TIPO DE BACE1	K_{ON} ($M^{-1}S^{-1}$)	K_{OFF} (S^{-1})	K_D (M)
YW412.8.31	Humana	$1,1 \times 10^5$ $1,05 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{-4}$ $1,39 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-9}$ $1,32 \times 10^{-9}$
YW412.8.31	De ratón	$1,4 \times 10^5$ $1,01 \times 10^5$	$2,9 \times 10^{-4}$ $1,41 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-9}$ $1,4 \times 10^{-9}$
YW412.8.31	De cobaya	$1,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-9}$

Se confirmó la unión de YW412.8.31 a BACE1 tanto a pH 7,0 como a pH 5,0. Esto es importante, pues BACE1 es óptimamente activa a pH ácido, presumiblemente en vesículas endocíticas y/o en la red trans-Golgi.

B. Ensayos de inhibición *in vitro*

Además, se evaluó *in vitro* la capacidad de los anticuerpos para modular la actividad proteolítica de BACE1 en ciertos sustratos BACE usando dos ensayos de actividad: el ensayo de HTRF y el ensayo electroforético capilar de microfluidos (MCE) con el dominio extracelular recombinante humano de BACE1.

El anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 de afinidad madurada se ensayó en un ensayo de HTRF como se describe en el Ejemplo 1. Como controles, se usaron un inhibidor peptídico sintético de BACE1, OM99-2 (CalBiochem®, n.º de catálogo 496000), un inhibidor de molécula pequeña de BACE1 (inhibidor β -secretasa IV, CalBiochem®, n.º de catálogo 5657688) y un anticuerpo IgG que no se une a BACE1. Véase la Figura 9 (Panel A) (péptido largo). Además, también se realizaron reacciones usando un péptido de FRET corto (Rh-EVNLDAEFK-desactivador (SEQ ID NO: 54), Invitrogen) de forma idéntica a las reacciones de HTRF. Los productos fluorogénicos resultantes de las reacciones de control se midieron como anteriormente, pero a una longitud de onda de excitación de 545 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm. Los datos obtenidos se analizaron usando GraphPad Prism 5™ (La Jolla, CA). Véase la Figura 9 (Panel A) (péptido corto).

Las reacciones de ensayo de MCE se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl por pocillo en una microplaca de 384 pocillos. Una reacción enzimática convencional, iniciada mediante la adición de 10 µl de sustrato x 2 a 5 µl de enzima x 4 y 5 ml de compuesto x 4, que contenía dominio extracelular de BACE1 humana 12 nM, 1 mM péptido de sitio activo de la proteína precursora amiloide-beta secretasa (FAM-KTEEISEVNLDAEFRWKK-CONH₂ (SEQ ID NO: 55)), NaOAc 50 mM, pH 4,4 y CHAPS al 0,1 %. Se usaron las mismas condiciones de reacción para el dominio extracelular de la enzima BACE2 humana (5 nM) y el dominio extracelular de la catepsina D (6 nM, Calbiochem®). Tras la incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente, se separaron el producto y el sustrato de cada reacción usando una microplaca microfluídica 12-Sipper analizada en un LC3000® (ambos, Caliper Life Sciences). La separación del producto y el sustrato se optimizó mediante la selección de las tensiones y la presión usando el software de optimización del fabricante. El tampón por separado contenía HEPES 100 mM, pH 7,2, Brij-35 al 0,015 %, reactivo de recubrimiento n.º 3 al 0,1 %, EDTA 10 mM y DMSO al 5 %. Las condiciones de separación usadas fueron una tensión de corriente abajo de - 500 V, una tensión de corriente arriba de -2250 V y una presión de exploración de -8,27 kPa (-1,2 psi). La fluorescencia del producto y del sustrato se excitó a una longitud de onda de 488 nm y se detectó en una longitud de onda de 530 nm. La conversión del sustrato se calculó a partir del electroferograma usando el software HTS Well Analyzer (Caliper Life Sciences).

Los resultados de los ensayos de HTRF y de MCE, usando el anticuerpo YW412.8.31, se muestran en la Figura 9. La CI_{50} observada de este anticuerpo en el ensayo de péptido largo resultó ser de 1,7 nM, alcanzando la inhibición máxima el 77 %. Además, el anticuerpo YW412.8.31 resultó tener una CI_{50} en el ensayo de péptido corto de 17 nM. Además, el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 inhibió la actividad de BACE1 con una CI_{50} de 80 horas, en el ensayo de electroforesis capilar de microfluidos, y no inhibió la BACE2 humana ni la catepsina D, una aspartil proteasa lisosomal. El análisis de SPR del anticuerpo YW412.8.31 también confirmó que el anticuerpo no se une a

BACE2, la proteasa más relacionada con BACE1. Estos datos juntos indican que el anticuerpo YW412.8.31 es un antagonista potente y selectivo de BACE1. Además, se realizó la caracterización de este anticuerpo para comprender mejor su función.

5 C. Ensayos de inhibición basados en células

Para determinar si la acción inhibitoria *in vitro* observada de los anticuerpos anti-BACE1 sobre el procesamiento de APP también estaba presente en un contexto celular, se realizaron estudios *in vivo*. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la producción $A\beta_{1-40}$ en células 293-HEK que expresan de forma estable la proteína precursora amiloide humana de tipo silvestre de la siguiente manera. Se sembraron durante la noche células 293-APP^{WT} a una densidad de 3×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron 50 μ l de medio recién preparado (DMEM + FBS al 10 %) que contenía un anticuerpo anti-BACE1 o un anticuerpo IgG1 de control con las células durante 24 horas a 37 °C. También se usó un inhibidor de BACE1 de molécula pequeña tricíclica (SMI de BACE1) como control ((Compuesto 8e - Charrier, N. *et al J. Med. Chem.* 51:3313-3317 (2008)). Se recogieron los medios celulares y se ensayaron para determinar la presencia de $A\beta_{1-40}$ usando un ensayo HTRF® para $A\beta_{1-40}$ (CisBio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se normalizaron los valores de $A\beta_{1-40}$ para la viabilidad celular, según lo determinado usando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo (Promega). Los experimentos se realizaron al menos tres veces, y se repitió cada punto de cada experimento dos veces. Los datos se representaron usando un programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software).

También se realizaron estudios similares en ganglios de la raíz dorsal, neuronas corticales y neuronas del hipocampo aisladas de ratones. En resumen, se prepararon cultivos neuronales disociados de ganglios de la raíz dorsal E13.5 (DRG), neuronas corticales E16.5 y neuronas del hipocampo E16.5. Las neuronas se cultivaron durante cinco días *in vitro*. Se incubaron medios recién preparados que contenían anticuerpo anti-BACE YW412.8.31 o IgG1 de control con las neuronas durante 24 horas. Se recogió el medio y se ensayó para determinar la presencia de $A\beta_{40}$ usando el kit ultrasensible hacia $A\beta_{40}$ de roedor/ser humano (4G8) MSD® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de $A\beta_{40}$ se normalizaron para la viabilidad celular, según lo determinado usando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo (Promega). El experimento se realizó al menos tres veces, y cada punto se repitió dos veces. Los datos se representaron usando un programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software).

Todos los anticuerpos anti-BACE1 analizados (LC6, LC9, YW412.8, YW412.8.30, YW412.8.31 y YW412.8.51) inhibieron la producción $A\beta_{1-40}$ en células 293 que expresaban APP, en comparación con un inhibidor de anticuerpos IgG no BACE1 (Xolair®). Véase la Figura 10.

Como se muestra en la Figura 11, el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 inhibió la producción de $A\beta_{1-40}$ en células 293 que expresaban APP en un grado similar al del SMI de BACE1 de control, con una CI_{50} de 17 nM y una reducción máxima del ~90 %. Se obtuvo un resultado similar en las neuronas de DRG, con una reducción del aproximadamente 50 % en la producción de $A\beta_{40}$ a las concentraciones más altas de YW412.8.31, y una CI_{50} de 8,4 nM. El anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 también inhibió la producción de $A\beta_{40}$ en las neuronas corticales y del hipocampo con una CI_{50} de 2,3-2,6 nM. Estos hallazgos indican que los anticuerpos anti-BACE1 funcionaron de manera similar en las células como ya se había observado *in vitro*. Además, el anticuerpo YW412.8.31 parece mostrar la mejor potencia en las neuronas del SNC.

45 D. Localización intracelular de anticuerpos anti-BACE1

Se sabe que BACE1 se expresa intracelularmente, en particular, en el aparato de Golgi. Para determinar si YW412.8.31 interactúa o no interactúa con BACE1 en un entorno intracelular, se realizaron estudios de interiorización. Se preparó un conjunto de cultivos neuronales a partir de explantes de ganglios de la raíz dorsal E13,5 (GRD), y se preparó un segundo conjunto de cultivos neuronales a partir de neuronas corticales disociadas E16.5 de ratones BACE1^{+/+} o BACE1^{-/-}, y se cultivaron durante 24 o 72 horas, respectivamente, a 37 °C. Se añadieron medios que contenían anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 0,5 μ M a los cultivos durante períodos de tiempo que variaban de 30 minutos a 2 horas, y se incubaron bien a 4 °C o a 37 °C. Se retiró mediante lavado a fondo el anticuerpo no unido con PBS después del tratamiento. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente, y las muestras seleccionadas también se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 %. El anticuerpo unido se detectó usando un anticuerpo IgG1 anti-humano conjugado con Alexa 568 secundario (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se encontró que la mayoría de la señal del anticuerpo se había interiorizado en las muestras de alta temperatura. Como puede verse en la Figura 12(B), BACE1 se puede detectar intracelularmente en los axones de DRG a 37 °C cuando se permeabilizan las células para permitir la detección de anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 con el anticuerpo secundario. A la inversa, cuando los GRD se incubaron en frío a 4 °C para evitar la interiorización, o cuando las células no se permeabilizan para permitir la detección intracelular de YW412.8.31, se detectó muy poca BACE1 en la superficie celular. La interiorización del anticuerpo en las neuronas resultó ser dependiente de la unión de BACE1, porque solo fue detectable en las neuronas corticales de animales BACE1 ^{+/+}, pero no en las neuronas

de los animales BACE1 -/- (compárense los paneles del centro y de la derecha de la Figura 12(C)).

Además, se cultivaron neuronas corticales de ratón en presencia de anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 o una IgG de control durante 10 minutos o 3 horas, tras lo que se detectó el anticuerpo mediante inmunotinción. Se prepararon cultivos neuronales de neuronas corticales disociadas E15.5, y se cultivaron durante 14 DIV. Se añadió medio que contenía YW412.8.31 1 μ M a los cultivos durante 10 minutos a 3 horas, y se incubaron a 37 °C. Se separó el anticuerpo no unido mediante lavado a fondo con HBSS después del tratamiento. Se fijaron los cultivos con paraformaldehído al 2 % durante 10 minutos a temperatura ambiente, y entonces bien se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % o no. El anticuerpo unido se detectó usando un anticuerpo IgG1 anti-humano conjugado con Alexa 568 secundario (Molecular Probes). Se analizó la ubicación de YW412.8.31 en las células no permeabilizadas, para ver cuánto se había unido en la superficie de las células, así como en las células permeabilizadas para ver cuánto anticuerpo se había interiorizado. La mayoría de la señal de anticuerpo detectada fue localizada intracelularmente, observándose poca tinción de anticuerpos en la superficie celular (Figura 12(A)). La interiorización se hizo evidente después de solo 10 minutos de tratamiento de YW412.8.31, lo que sugiere que el anticuerpo es absorbido de forma activa por los endosomas tempranos. Gran parte de la señal de YW412.8.31 estaba punteada, indicando que probablemente estaba contenida dentro de las vesículas.

Para identificar mejor los compartimentos subcelulares en los que se localizó YW412.8.31, se realizaron tinciones conjuntas con marcadores de diferentes compartimentos vesiculares: endosomas tempranos (receptor de transferrina, TfR), red trans-Golgi (TGN) (VAMP4) y lisosoma (LAMP1). Las células se tiñeron conjuntamente con anti-TfR (Novus, n.º de cat. NB100-64.979), anti-VAMP4 (Novus, n.º de cat. NB300-533) o anti-LAMP1 (BD Pharmingen, n.º de cat. 553792). La inmunorreactividad de YW412.8.31 se localizó conjuntamente con marcadores para los endosomas tempranos y TGN, pero no para los lisosomas (Figura 12(A)). Este patrón coincide con el anticuerpo localizado en los compartimentos en los que BACE1 está activa.

EJEMPLO 3: CARACTERIZACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-BACE1

Se realizaron estudios adicionales para identificar el sitio de unión de ciertos anticuerpos anti-BACE1 a BACE1 humana. En un conjunto de experimentos, se evaluó la unión de los anticuerpos a BACE1 (hBACE1) en presencia o ausencia de péptidos de unión a BACE1 de sitio activo o exosito conocido para determinar qué anticuerpos demostraban la unión competitiva. En un segundo conjunto de experimentos, se cristalizó conjuntamente un Fab anti-BACE1 con el dominio extracelular de BACE1 humana para determinar el sitio de unión tridimensional.

A. Unión competitiva

Como método indirecto para la determinación del sitio de unión en BACE1 de los anticuerpos anti-BACE1 de la invención, se realizó un ELISA competitivo. En resumen, se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos de NUNC con anticuerpo IgG YW412.8 (1 μ g/ml) durante la noche a 4 °C y se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora con el tampón de bloqueo PBST (PBS y BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 %). Se incubaron diluciones en serie de anticuerpo anti-BACE1 YW412.8 o un péptido de unión a hBACE1 con una cantidad predeterminada de hBACE1 biotinilada y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadieron entonces las diluciones en serie a una placa recubierta con YW412.8 y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron las placas con tampón de lavado (PBS con T-20 al 0,05 %) y se revelaron mediante la adición de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las placas y se revelaron con sustrato tetrametilbencidina (TMB). Se midió la unión de estreptavidina conjugada con HRP a hBACE1 biotinilada capturada a una longitud de onda de 630 nm usando técnicas convencionales.

Para determinar la concentración óptima de proteína diana biotinilada usada para el ensayo de ELISA de competición anterior, se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos de NUNC y se bloquearon como se ha descrito anteriormente. Se incubaron diluciones en serie de la diana biotinilada con las placas recubiertas de anticuerpos durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las placas con PBST, seguido de la incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección de la señal de unión fue como se ha descrito anteriormente. Los datos se representaron gráficamente usando un programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software). Se determinó la concentración de subsaturación de hBACE1 biotinilada a partir del ajuste de curvas y se aplicó al ELISA de competición anterior.

Como era de esperar, YW412.8 compitió consigo mismo por la unión a hBACE1 (Figura 13). No se observó ninguna competencia entre YW412.8 y un péptido inhibidor del sitio activo OM99-2 (CalBiochem®, n.º de catálogo 496000). Se observó una competencia entre los anticuerpos anti-BACE1 LC6 y YW412.8 y un péptido de unión a exosito conocido, BMS1 (Péptido 1 de Kornacker *et al.*, *Biochemistry* 44:11567-11572 (2005)). En conjunto, estos resultados sugieren que YW412.8 se une a un exosito de BACE1 diferente al sitio activo de BACE1 para la escisión de APP. La forma de las curvas de la Figura 13 sugiere que YW412.8, LC6 y BMS1 pueden tener sitios de unión superpuestos en BACE1.

B. Estructura cristalina

Para entender mejor la interacción del anticuerpo YW412.8 con BACE1, se cristalizó conjuntamente el Fab YW412.8.31 con el dominio extracelular de BACE1 recombinante humana.

Expresión y purificación de proteínas

Se sintetizó la expresión de proteínas y purificación del ADN de BACE1 (aminoácidos 57-453 de SEQ ID NO: 49) con el marcador His6 C-terminal (SEQ ID NO: 210) con Blue Heron, se clonó en el vector pET29 (+) (Novagen), y se transformó en células BL21 (DE3) (Invitrogen). La expresión se realizó a 37 °C durante 4 horas con la inducción de β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 1 mM. Se lisaron las células con un microfluidificador, y se aislaron los cuerpos de inclusión (que contenían BACE1), y se lavaron dos veces con tampón TE (Tris 10 mM, pH 8,0 y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM. Se realizó la solubilización de las proteínas usando urea 7,5 M, AMPPO 100 mM, pH 10,8, y β-mercaptoetanol (BME) 100 mM a temperatura ambiente durante 2 horas antes de la centrifugación a 12.000 rpm durante 30 min. Se diluyó el sobrenadante con urea 7,5 M, AMPPO 100 mM, pH 10,8 hasta alcanzar una DO₂₈₀ de aproximadamente 1,5-2,0. Se realizó el replegamiento de las proteínas diluyendo primero BACE1 solubilizada a 1:20 en agua fría, y a continuación, agitando suavemente la muestra a 4 °C durante 3 semanas para permitir que el replegamiento tuviera lugar. La purificación del BACE1 replegada incluyó 3 etapas de cromatografía en columna. En primer lugar, se cargó la BACE1 en una columna de flujo rápido de 50 ml de Q Sefarosa (GE Healthcare) previamente equilibrada con Tris 20 mM, pH 8,0 y urea 0,4 M, y se eluyó con un gradiente salino de NaCl 0-0,5 M. Se combinaron las fracciones pico, se diluyeron 5 veces con tampón de Tris 20 mM, pH 8,0, y se cargaron en una columna SourceTM15Q (GE Healthcare). Se usó un gradiente de NaCl 0-0,3 M para eluir BACE1. Se combinaron las fracciones que contenían proteína BACE1, se concentraron y se purificaron adicionalmente en una columna Superdex™ S75 (GE Healthcare) en Hepes 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM.

Se expresó el Fab YW412.8.31 en *E. coli* y se descongeló la pasta celular en PBS, EDTA 25 mM y PMSF 1 mM. Se homogenizó la mezcla, se pasó dos veces a través de un microfluidificador y se centrifugó a 12.000 rpm durante 60 min. A continuación, se cargó el sobrenadante en una columna de Proteína G a 5 ml/min. Se lavó la columna con PBS hasta la línea basal, y se eluyó la proteína con ácido acético al 0,58 %. Se combinaron las fracciones que contenían el Fab YW412.8.31 y se cargaron en una columna SP-Sefarosa equilibrada con MES 20 mM, pH 5,5, y se eluyó el Fab con un gradiente salino de NaCl 0-0,25 M. Se purificó más el Fab en una columna Superdex™ S75 en Hepes 25 mM, pH 7,5, y NaCl 150 mM.

Cristalización

Se mezcló proteína BACE1 purificada (aminoácidos 57 a 453 de SEQ ID NO: 49) con Fab YW412.8.31 purificado en una relación molar de 1:1,5 (exceso de Fab). Se incubó el complejo durante 1 hora en hielo y se purificó en una columna de filtración de gel S200 26/60 (GE Healthcare) para separarlo del exceso de Fab. A continuación, se concentró el complejo a 15 mg/ml. La cristalización se realizó mediante el método de difusión de vapor de gota sentada con 1 μl de solución de complejo de BACE1/Fab mezclada con 1 μl de solución del pocillo que contenía PEG 4000 al 20 %, Tris 0,1 M, pH 8,5 y acetato de sodio 0,2 M. Se incubaron las gotas de cristalización a 19 °C. Los cristales aparecieron tras 4 días y siguieron creciendo durante 2 días más. Se recogieron los cristales y se congelaron rápidamente en una solución crioprotectora que contenía licor madre y glicerol al 20 %).

Recogida de datos y determinación de la estructura

Los datos de difracción se recopilaron mediante un haz de rayos X monocromático (12658.4eV) de la línea de haces 7-1 del Centro Stanford Synchrotron Radiation (SSRL). El dispositivo de detección de rayos X era un detector CCD quantum-315 ADSC colocado a 430 mm de distancia del cristal. Se aplicó un método de rotación a un solo cristal para la recogida del conjunto de datos completo, con oscilación de 0,5 ° por trama y tamaño total de la cuña de 180 °. A continuación, se indexaron los datos, se integraron y se ampliaron a escala usando el programa HKL2000® (HLK Research, Inc.).

Se resolvió la estructura usando el método de sustitución molecular (MR) con el programa Phaser (Read, R. J., *Acta Cryst.* D57:1373-1382 (2000)). Los resultados del cálculo del coeficiente de Matthews indicaron que cada unidad asimétrica se componía de un complejo de BACE1/Fab y disolvente al 48 %. Por lo tanto, el cálculo de la MR se dirigió a la búsqueda de un conjunto de tres subunidades, que incluía los dominios N y C-terminales de los fragmentos Fab, y el dominio extracelular de BACE1. Los dominios Fab N- y C-terminales se buscaron por separado para permitir un ángulo de codo flexible. Los modelos de búsqueda de las subunidades Fab se obtuvieron de la estructura cristalina del complejo de HGFA/Fab (código PDB: 2R0L, Wu, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 104:19784-19789 (2007)). El modelo de búsqueda de BACE1 procede del código PDB de estructura de BACE1 publicado: 1FKN (Hong, L. *et al.* *Science* 290:150-153 (2000)). Los cambios conformacionales significativos tienen lugar en la interfase de BACE1/Fab. Se realizó la reconstrucción manual con el programa COOT ((Crystallographic Object-Oriented Toolkit) (Emsley y Cowtan, *Acta Cryst.* D60:2126-2132 (2004)). Se llevó a cabo el perfeccionamiento de la estructura de forma iterativa con el programa REFMAC5 (Murshudov, G. N., *et al.*, *Acta Cryst.* D53:240-255 (1997)) y PHENIX (Python-based Hierarchical Environment for Integrated Xtallography) (Adams,

P.D. *et al. Acta. Cryst. D66:213-221 (2010)*), usando las funciones diana de probabilidad máxima, para lograr un factor R final del 0,221 y un R_{libre} de 0,274. En la Tabla 5, se muestran las estadísticas de perfeccionamiento de la estructura.

TABLA 5 - Estadística de los datos cristalográficos

Recogida de datos	
Grupo espacial	P21
Unidad de celda	a = 46,1 Å, b = 75,5 Å, c = 112,0 Å, a = 90 ° b = 99,8 ° g = 90 °
Resolución	30 - 2,8 Å
Número total de reflexiones	64.939
Integridad	97,9 % (84,4 %)²
Redundancia	3,5 (2,5)
I/σ	10.8(2.0)
Rsim¹	0,112 (0,366)
Perfeccionamiento	
Intervalo de resolución	30-2,8 Å
Rcrist³/Rlibre⁴	0,221/0,274
Tamaño del conjunto de ensayos de R libre	5 % de las reflexiones observadas
Átomos no de hidrógeno	6.324
Moléculas de agua	94
B medio, global	37,3
Proteína	37,6
Agua	29,7
Longitudes de los enlaces r.m.s.d	0,003 Å
Ángulos de r.m.s.d.	0,705 °
¹Rsim = $\sum I_{hi} - I_h / \sum I_{hi}$, donde I_{hi} es la intensidad a escala de la observación relacionada con la simetría i th de la reflexión h e I_h es el valor medio.	
²Los valores entre paréntesis son de la cubierta de resolución más alta, que es (1,97-1,90 Å).	
³Rcrist = $\sum F_{oh} - F_{ch} / \sum F_{oh}$, donde F_{oh} y F_{ch} son las amplitudes de los factores de estructura calculadas para la reflexión h .	
⁴El valor de Rlibre se calcula para las reflexiones seleccionadas aleatoriamente al 5 %, no incluidas en el perfeccionamiento.	

5 El cristal fue difractado, y se perfeccionó la estructura a una resolución de 2,8 Å. La estructura general de BACE1 en el complejo se asemeja en gran medida a su forma libre (Hong *et al.*, *Science* 290:150-153 (2000)), que se puede alinear con RMSD de 0,63 Å en las posiciones de los átomos de Cα del 96 % (373/385) de los residuos. El Fab YW412.8.31 cubre una superficie de ~840 Å² en la superficie molecular de BACE1, y no se une en la proximidad del sitio activo. El epítipo comprende elementos estructurales denotados por Hong *et al.* (*Science* 290:150-153 (2000)) como bucle C (aminoácidos 315-318 de BACE1 de longitud completa), D (aminoácidos 331-335 de BACE1 de longitud completa) y F (aminoácidos 370-381 de BACE1 de longitud completa), que se sitúan cerca en el espacio tridimensional. Además, la parte de BACE1 de y de la proximidad del sitio de unión a YW412.8.31 adoptó un cambio conformacional, dando lugar a una puntuación complementaria de la forma de 0,71, de acuerdo con una unión fuerte. Se cree que el cambio conformacional inducido por el anticuerpo contribuye a la inhibición alostérica de la actividad secretasa.

20 El Fab unido a un exosito distal al sitio activo de BACE1 para la proteína precursora amiloide, que se superpone parcialmente con el exosito previamente identificado como el sitio de unión para un panel de péptidos de unión a BACE1 (Kornacker *et al.*, *Biochemistry* 44:11567-11572 (2005) (Figura 14). Tanto las cadenas pesadas como ligeras participan en la interacción (Figura 15). A diferencia de la forma libre, en la que la región del epítipo de BACE1 es más dinámica según lo indicado por factores de alta temperatura, la estructura unida al anticuerpo se estabiliza en una confirmación única, que deforma los sitios P6 y P7 (Turner *et al.*, *Biochemistry* 44:105-112 (2005)) de la

secretasa. Junto a estos sitios, los aminoácidos 218-231 (AGFPLNQSEVLASV (SEQ ID NO: 126) de SEQ ID NO: 49 (restos 157-170 en Lin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:1456-1460 (2000) (la numeración de los aminoácidos comienza en el dominio maduro de la proteasa de BACE1)), que adoptan una estructura α -helicoidal en el complejo unido al sustrato, se convierten en un bucle aleatorio en el complejo de anticuerpo, lo que afecta negativamente a la escisión proteolítica de APP, quizás evitando que APP alcance la hendidura catalítica de BACE1 de una manera competente catalítica. El epítipo estructural incluye los restos de aminoácidos de BACE1 que contienen uno o más átomos situados a 4 Å de distancia de cualquier parte del Fab YW412.8.31 en la estructura cristalina. Los restos de la cadena ligera de Fab pertenecen a la cadena L, y los restos de la cadena pesada de Fab pertenecen a la cadena H de la Tabla 6 que figura a continuación. La numeración de los restos de aminoácidos de BACE1 se basa en la secuencia de longitud completa de BACE1 (SEQ ID NO: 49). La numeración de los restos de aminoácidos de Fab se basa en el esquema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

TABLA 6 - Restos ubicados en la superficie de contacto de la unión de YW412.8.31-BACE1

Restos de BACE1	Restos de Fab
314 SER	H 26 GLY
316 GLU	H 27 PHE
317 LYS	H 28THR
318 PHE	H 30 LEU
319 PRO	H 31 GLY
327 GLN	H 32 TYR
328 LEU	H 53 ALA
329 VAL	H 58 ASP
330 CYS	H 94 ARG
331 TRP	H 96 PRO
332 GLN	H 97 PHE
333 ALA	H 98 SER
335 THR	H 99 PRO
337 PRO	H100TRP
340 ILE	
375 THR	L 49 TYR
378 ASP	L 53 PHE
380 CYS	L 55 TYR
426 PHE	L 56 SER
	L 94 TYR

Las interacciones atómicas detalladas están en forma de contactos de van der Waals de las interacciones polares. Las interacciones polares incluyen enlaces de hidrógeno y puentes de sal. La Tabla 7 que figura a continuación incluye una lista de las interacciones polares por parejas entre BACE1 y el Fab YW412.8.31. Los restos de la cadena ligera de Fab pertenecen a la cadena L, y los restos de la cadena pesada de Fab pertenecen a la cadena H. La numeración de los restos de aminoácidos de BACE1 se basa en la secuencia de longitud completa de BACE1 (SEQ ID NO: 49). La numeración de los restos de aminoácidos de Fab se basa en el esquema de numeración de Kabat.

TABLA 7 - Interacciones polares por parejas entre BACE1 y el Fab YW412.8.31

Restos de BACE1 ---restos de Fab
314 SER---H 98 SER
317 LYS---H 58 ASP

Restos de BACE1 ---restos de Fab
327 GLN---H 53 ALA
330 CYS---H 31 GLY
331 TRP---H 98SER
331 TRP---H 32 TYR
332 GLN---H 32 TYR
378 ASP---H 32 TYR
316 GLU---L 94 TYR
332 GLN---L 55 TYR
335 THR---L 49 TYR

5 Como se muestra a continuación, la composición de aminoácidos del epítipo del anticuerpo BACE1 YW412.8.31 está poco conservada entre las regiones correspondientes de BACE2 y catepsina D. Esta diferencia de aminoácidos en el epítipo para el anticuerpo YW412.8.31 coincide con la observación de que el anticuerpo es altamente selectivo hacia BACE1. La numeración se basa en la secuencia de longitud completa de BACE1 (SEQ ID NO: 49). Las secuencias de BACE2 y catepsina D se alinean con BACE1 basándose en sus respectivas estructuras de cristal. Los restos del epítipo de BACE1 YW412.8.31 aparecen en un recuadro.

```

      312          322          332          372
BACE1 *** AEE[REKPPDG FWLGE[GLYCN QAC[ ]MIF *** DVARS[ ]EY *** SEQ ID NOS123 y 130
BACE2 *** ASLIFEPSDG FWTGSQIACN INSEIEMSYE *** MGAGLEIYCY *** SEQ ID NOS124 y 131
CatD *** ---VPLIQG EYM--IPCE KVET----L *** SQAG-KTLCL *** SEQ ID NOS125 y 132
    
```

10 EJEMPLO 4: CARACTERIZACIÓN IN VIVO - RATONES

Se evaluó el efecto de YW412.8.31 *in vivo*. Para establecer la reducción máxima de Aβ₁₋₄₀ que un inhibidor específico de BACE1 podría lograr, se examinó la contribución de BACE1 en la producción de Aβ₁₋₄₀ en plasma y cerebro anterior de ratones BACE1^{-/-} en comparación con los controles de BACE1^{+/+}. La señal de Aβ₁₋₄₀ en plasma se redujo en un 45 %, y la señal de Aβ₁₋₄₀ en el cerebro, en un 80 % en ratones BACE1^{-/-} (Figura 16, panel A). Estos resultados implican que BACE1 es, de hecho, la principal β-secretasa del cerebro anterior, pero que, en la periferia, BACE1 solo es responsable de la producción parcial de Aβ₁₋₄₀, procediendo el resto de otra β-secretasa.

20 Comprendiendo la contribución de BACE1 en la producción de Aβ, se evaluó la capacidad del anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 para modular el procesamiento amiloidogénico en ratones transgénicos y de tipo silvestre hAPP.

Ratones transgénicos hAPP

25 En resumen, se trataron ratones de 5 meses de vida con expresión de APP humana con 30 mg/kg o 100 mg/kg de anticuerpo YW412.8.31 o vehículo mediante inyección intraperitoneal cada cuatro días para un total de tres dosis (es decir, en los días 1, 5 y 9). Los animales se sacrificaron dos horas después de la dosis final. Se extrajeron suero, plasma y los cerebros, y se procesaron. Se analizaron el plasma, la corteza y el hipocampo para determinar los niveles de Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂ solubles usando un kit de ensayo ELISA para amiloide-beta (Aβ) según las instrucciones del fabricante (The Genetics Company). El análisis farmacocinético se realizó en suero y en homogenizados cerebrales.

35 Los resultados mostraron que los niveles de Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂ en plasma se redujeron hasta aproximadamente el 30 % de los niveles de control, a niveles de dosis de anticuerpo YW412.8.31 tanto de 30 mg/kg como de 100 mg/kg (Figura 17(A), paneles superiores, y Figura 18, panel A). Sin embargo, en contraste con lo observado en los ratones de tipo silvestre, que se describen a continuación, los niveles de Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂ en el cerebro se redujeron en solo 15-22 % al nivel de dosis del anticuerpo YW412.8.31 de 100 mg/kg (Figura 17(A), paneles inferiores, y Figura 18, panel A). La concentración de anticuerpo YW412.8.31 en el cerebro de los animales tratados aumentó de una manera dependiente de la dosis, con una concentración observada de anticuerpo en el cerebro en los animales tratados con 30 mg/kg de 4,8 ± 3,6 nM y una concentración observada de anticuerpo en el cerebro en los animales tratados con 100 mg/kg de 14,0 ± 9,3 nM, lo que confirma que una dosis superior administrada por vía intraperitoneal de anticuerpo se tradujo, de hecho, en una dosis superior de anticuerpo observada en el cerebro. La representación de las lecturas farmacocinéticas individuales frente a las lecturas farmacodinámicas sugirió que existe una relación de farmacocinética/farmacodinámica para este anticuerpo en este modelo (Figura 17(B)).

También se realizaron experimentos similares en los que se administró anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 sistémica o directamente en cerebros de ratones transgénicos hAPP por infusión continua i.c.v. Para la administración i.c.v., el anticuerpo se suministró de forma continua durante 7 días a través de una minibomba osmótica Alzet (modelo 2001) implantada de forma unilateral. La cantidad de anticuerpo YW412.8.31 suministrada fue de 0,041 mg/día (dosis baja) o de 0,41 mg/día (dosis alta); se suministraron 0,33 mg/día de IgG de control al grupo control. En la eutanasia, se recogieron plasma, corteza e hipocampo, y se analizaron para determinar los niveles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ solubles mediante ELISA (The Genetics Company) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La siguiente Tabla 8 muestra las concentraciones de anticuerpo YW412.8.31 en el cerebro de los ratones dosificados con 30 mg/kg o 100 mg/kg mediante administración sistémica o 0,041 mg/día y 0,41 mg/día mediante administración i.c.v.

TABLA 8

	DOSIS	CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO EN CEREBRO (μ g/g)	CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO EN CEREBRO (nM)
Administración sistémica	30 mg/kg	0,7	4,8
	100 mg/kg	2,1	14
Administración i.c.v.	Baja (0,041 mg/día)	13-25	87-167
	Alta (0,41 mg/día)	110-305	733-2003

Sin embargo, a pesar de los altos niveles de anticuerpo en el cerebro tras la infusión, la reducción de A β fue modesta al 15-23 %, y fue similar a la reducción observada con la administración sistémica (Figura 18, panel B). Dicha observación sugiere que la inyección sistémica de una dosis alta puede ser capaz de reducir los niveles de A β en ratones transgénicos hAPP, sin embargo, la reducción es modesta. La reducción de la eficacia en los ratones transgénicos hAPP se cree que es una consecuencia del modelo de animal, ya que las altas concentraciones en el cerebro, que equivalen a la concentración en suero después de la administración sistémica, no redujeron aún más la producción de A β . Además, la reducción en el cerebro en los ratones transgénicos hAPP es modesta en comparación con la observada en los ratones de tipo silvestre, y se describe a continuación. Por lo tanto, los ratones transgénicos hAPP no pueden ser ideales para el estudio de los efectos anti-BACE1 *in vivo*. Los ratones de tipo silvestre son un modelo más apropiado para la eficacia de los anticuerpos desde un punto de vista de la enfermedad, también, pues la inmensa mayoría de la población de pacientes de Alzheimer porta un alelo de APP de tipo silvestre.

Ratones de tipo silvestre

También se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-BACE1 YW412.8.31 para modular el procesamiento amiloidogénico en ratones de tipo silvestre. En resumen, se realizaron experimentos como se ha descrito anteriormente. Se administró sistémicamente una sola dosis de anticuerpo IgG de control o anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 (50 mg/kg) por inyección intravenosa (i.v.) a los ratones de tipo silvestre. Después de 24 o 48 horas, se recogieron muestras de plasma y de cerebro, y se analizaron los niveles de A β ₁₋₄₀. Las concentraciones de A β ₁₋₄₀ total de ratón en plasma y en cerebro se determinaron usando un ELISA de tipo sándwich siguiendo procedimientos similares a los descritos a continuación para medir las concentraciones totales de anticuerpos anti-BACE1. En resumen, se recubrieron placas con anticuerpo policlonal de conejo específico del extremo C-terminal de A β ₁₋₄₀ (Millipore, Bedford, MA), y se usó anticuerpo monoclonal anti-A β de ratón biotinilado M3.2 (Covance, Dedham, MA) para la detección. El ensayo tenía un límite inferior de los valores de cuantificación de 1,96 pg/ml en plasma y de 39,1 pg/g en el cerebro. Como se muestra en la Figura 16, panel B, el A β ₁₋₄₀ en plasma se redujo en un 35 % y el A β ₁₋₄₀ cortical se redujo en un 20 %.

Se realizaron experimentos adicionales con ratones C57B1/6J de tipo silvestre en los que se administraron 100 mg/kg de YW412.8.31 o una IgG de control por vía sistémica. Se determinaron los niveles de A β ₁₋₄₀ tanto en el plasma como en el cerebro anterior de los animales tratados cuatro horas después de una sola inyección intraperitoneal (i.p.). Se recogió sangre de los animales mediante punción cardiaca para aislar el plasma. Tras la perfusión de PBS, se recogió el cerebro, y se preparó el cerebro anterior de medio cerebro en tampón PK (NP-40 al 1 % en PBS, con inhibidores completos de la proteasa de Roche), mientras que el cerebro anterior de la otra mitad del cerebro se homogenizó en GuHCl 5 M, Tris 50 mM, pH 8,0, y se diluyó adicionalmente en tampón de bloqueo de caseína (caseína al 0,25 %/azida de sodio al 0,05 %, 20 μ g/ml de aprotinina/EDTA 5 mM, pH 8,0/10 μ g/ml de leupeptina en PBS) para el análisis de A β ₁₋₄₀.

Como se muestra en la Figura 22, panel A, la dosis de 100 mg/kg fue capaz de reducir el $A\beta_{1-40}$ en plasma en ~50 % de los niveles de control y de manera similar a los niveles de desactivación de BACE1 descritos anteriormente. Sin embargo, no se detectó ningún cambio en el $A\beta_{1-40}$ del cerebro anterior a las 4 horas de la administración. Este punto de tiempo prematuro puede ser demasiado poco tiempo después de la administración de YW412.8.31 para que se pueda observar un efecto en el cerebro. Puede que sea necesario un período de tiempo más largo posterior a la administración para poderse observar la reducción de $A\beta$ en el cerebro, sobre todo porque se observa una reducción de $A\beta$ en ratones de tipo silvestre a una dosis más baja (50 mg/kg) a las 24 horas, como se ha descrito anteriormente. Las concentraciones de YW412.8.31 en suero fueron muy altas, $1.040 \pm 140 \mu\text{g/ml}$ ($6,9 \pm 0,9 \mu\text{M}$) a las 4 horas después de la administración. Las concentraciones de YW412.8.31 en el cerebro fueron mucho más bajas a $0,7 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ ($4,7 \pm 2,7 \text{ nM}$), lo que representaba ~0,07 % de la concentración en el suero, que se aproxima estrechamente a la penetración en estado estable del 0,1 % predicha de los anticuerpos en el SNC (Reiber y Felgenhauer, *Clin. Chim. Acta.* 163:319-328 (1987). Es importante destacar que la concentración de anticuerpo alcanzada en el cerebro, $4,7 \pm 2,7 \text{ nM}$, es casi la CI_{50} celular que se observó anteriormente (Figura 11). Así pues, el anticuerpo anti-BACE1 es muy eficaz *in vivo*, como se demuestra por la reducción de $A\beta_{1-40}$ en plasma hasta los niveles observados en los ratones con desactivación de BACE1. Sin embargo, una sola dosis sistémica no produjo la reducción en el cerebro mediante la administración a las 4 horas a ratones, en su mayoría probablemente debido a que el punto de tiempo era demasiado pronto para observar cualquier efecto.

Se realizaron experimentos adicionales con el fin de determinar el efecto de los niveles elevados de anticuerpos en el cerebro a través de la administración repetida. Se administró anticuerpo YW412.8.31 o IgG de control a 30 o 100 mg/kg i.p. cada 4 días para un total de 3 dosis. En este estudio, se midieron los niveles de $A\beta_{1-40}$ tanto en plasma como en el cerebro anterior de los animales tratados 4 horas después de la última dosis. Una vez más, se observó una reducción de ~50 % en los niveles de $A\beta_{1-40}$ en plasma tras las múltiples dosis, tanto a 30 como a 100 mg/kg (Figura 22, panel B). Sorprendentemente, se observó una reducción de $A\beta_{1-40}$ del 42 % en cerebro anterior a la dosis alta de anti-BACE1, aunque no se observó reducción alguna a la dosis baja. Las concentraciones de anticuerpo YW412.8.31 en suero fueron de 480 ± 210 y $1.500 \pm 440 \mu\text{g/ml}$, y las concentraciones en el cerebro fueron de $0,9 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$ ($5,9 \pm 4,3 \text{ nM}$) y de $3,0 \pm 1,6 \mu\text{g/g}$ ($20 \pm 10 \text{ nM}$) tras la administración a 30 y 100 mg/kg administrados cada 4 días, respectivamente. De este modo, como se predijo, los niveles de anticuerpos más altos en el cerebro produjeron fuertes reducciones en los niveles de $A\beta$. En particular, no hubo diferencia en los niveles de $A\beta$ periféricos a la dosis de 30 mg/kg en comparación con la dosis de 100 mg/kg, lo que sugiere que se alcanzó una inhibición periférica máxima a 30 mg/kg y, por tanto, la simple reducción de los niveles de $A\beta$ periféricos no basta para reducir los niveles cerebrales.

Además, se obtuvieron datos farmacocinéticos tras la administración de anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 a ratones de tipo silvestre y con desactivación de BACE1. Véase la Figura 19. Se administró una sola dosis de anti-BACE1 (1 o 10 mg/kg) a través de la inyección i.v. a ratones BALB/C. La farmacocinética del suero se analizó 21 días después de la dosis.

Las concentraciones de anticuerpo anti-BACE1 totales en muestras de suero y de cerebro de ratón se midieron de la siguiente manera. Las concentraciones de anticuerpo en muestras de suero y de cerebro de ratón se midieron usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp de 384 pocillos de NUNC (Neptune, NJ) con fragmento $F(ab')_2$ de IgG anti-humana de burro, anticuerpo policlonal específico del fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se bloquearon las placas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Cada anticuerpo (IgG de control y anti-BACE1) se usó como un patrón para cuantificar las concentraciones de anticuerpos respectivos. Después de lavar las placas con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % usando un lavador de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT), se incubaron los patrones y las muestras diluidas en PBS que contenía BSA al 0,5 %, NaCl 0,35 M, CHAPS al 0,25 %, EDTA 5 mM, Tween 20 al 0,05 % y 15 ppm de Proclin en las placas durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se detectó el anticuerpo unido con IgG anti-humana de cabra $F(ab')_2$ conjugada con peroxidasa de rábano picante, anticuerpo policlonal específico de Fc (Jackson ImmunoResearch). Por último, se revelaron las placas usando el sustrato 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con una referencia de 630 nm en un lector Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Se determinaron las concentraciones a partir de la curva patrón usando un programa de regresión no lineal de cuatro parámetros. El ensayo tenía límite inferior de los valores de cuantificación (LLOQ) de 3,12 ng/ml en el suero y de 15,6 ng/g en el cerebro.

Se detectaron concentraciones de anticuerpo YW412.8.31 libre en ratones siguiendo procedimientos similares a los descritos anteriormente usando ECD de BACE1 como cubierta e IgG anti-humana, anticuerpo específico de Fc (Jackson ImmunoResearch) para la detección. El ELISA de ratón de anti-BACE1 libre tenía valores de LLOQ de 0,626 ng/ml en el suero y de 3,13 ng/g en el cerebro.

Se usaron dos ensayos PK separados: un ensayo para detectar todos los YW412.8.31 en el suero (mAb total), y un ensayo para detectar solamente el YW412.8.31 no unido en el suero (mAb libre). Los datos cinéticos PK observados resultaron ser no lineales, y la diferencia en total frente a los valores de mAb libre para las muestras en las que la

concentración de YW412.8.31 es $< 10 \mu\text{g/ml}$ sugiere la eliminación mediada por la diana. Véase la Figura 19, panel A. Por otra parte, la diferencia entre el mAb total y el mAb no unido indica que algunos de los YW412.8.31 en el suero probablemente se unieron a BACE1 soluble. El análisis PK de una sola dosis en ratones BACE1+/, BACE1+/- y BACE -/- confirma la no linealidad observada en el estudio inicial, e indica que la eliminación mejorada está verdaderamente mediada por la diana. Los ratones BACE1-/- muestran PK lineal. Véase la Figura 19 (Panel B).

EJEMPLO 5: CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* - MONO

Se administraron a macacos cangrejeros IgG de control o anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 (30 mg/kg) mediante administración i.v. Se tomaron muestras de plasma y de LCR hasta 7 días antes de la dosificación para ajustar los niveles basales medios de $A\beta_{1-40}$ en cada animal, y luego en diversos momentos después de la dosificación. Se midieron las concentraciones totales de anti-BACE1 o de anticuerpo de control en muestras de suero y LCR de mono usando anticuerpo policlonal IgG anti-humano de cabra adsorbido en mono (Bethyl, Montgomery, TX), como cubierta y como detección (Figura 20). Las concentraciones de anticuerpo anti-BACE1 libre en monos se determinaron usando ECD de BACE1 como cubierta y anticuerpo IgG anti-humano de cabra adsorbido en mono (Bethyl) para la detección. Ambos ensayos en monos de anti-BACE1 total y libre tenían un valor de LLOQ de 6,25 ng/ml en suero o LCR. La PK es como se esperaba para IgG1 administrada a monos, y muestra la exposición predicha.

También se determinaron los niveles de $A\beta_{1-40}$ en plasma y en LCR de los macacos cangrejeros ensayados. En resumen, se determinaron las concentraciones de $A\beta_{1-40}$ de macaco cangrejero en plasma usando el Kit de Abeta humano MSD MA6000 (6E10) (n.º de cat. K111BVE-2, Meso Scale Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recubrieron placas previamente con el anticuerpo de captura, específico del extremo C-terminal de $A\beta_{1-40}$, y se usó anticuerpo monoclonal anti- $A\beta$ marcado con sulfo 6E10 para la detección. El ensayo tenía límite inferior de los valores de cuantificación de 49,4 pg/ml en plasma. Las concentraciones de $A\beta_{1-40}$ totales en el LCR de macaco cangrejero se determinaron usando un ELISA de tipo sándwich. Se recubrieron placas con anticuerpo policlonal de conejo específico del extremo C-terminal de $A\beta_{1-40}$ (n.º de cat. AB5737, Millipore, Bedford, MA), y para la detección se usó anticuerpo monoclonal anti- $A\beta$ marcado biotinilado 6E10 (n.º de cat. SIG-39340, Covance, Dedham, MA). El ensayo tenía un límite inferior de los valores de cuantificación de 15,6 pg/ml en el LCR.

Como se muestra en la Figura 21 (Panel A), los niveles de $A\beta_{1-40}$ en plasma se redujeron ~50 % de la línea basal a través de todos los individuos. El 50 % de las reducciones máximas en plasma de $A\beta$ se mantuvieron durante el período de observación de 7 días. El perfil de concentración en plasma-tiempo de anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 resultó ser similar al observado para el anticuerpo IgG de control, lo que sugiere una cinética similar a la de una IgG1 típica dosificada en el intervalo lineal (Figura 20, panel A). No se observaron concentraciones máximas de anticuerpo en suero de ~800 $\mu\text{g/ml}$ en el momento de la primera recogida de muestras a los 15 minutos de la administración y cayeron hasta 232 $\mu\text{g/ml}$ a los 7 días de la dosis. Cabe destacar que, en todos los puntos de tiempo medidos después de la dosificación, las concentraciones en suero de YW412.8.31 superaron la CI_{50} celular (~2,5 nM, véase la Figura 11).

Los niveles de $A\beta_{1-40}$ del LCR, como se muestra en la Figura 21 (Panel B), aunque variables, mostraron una reducción de hasta el 50 % a los 1 y 3 días de la dosificación, seguida de una tendencia hacia el nivel de $A\beta$ basal hacia el día 7 posterior a la dosis. La variabilidad en los niveles en plasma y LCR basales se muestra en la Figura 21 (paneles C y D). Los niveles en plasma basales fueron bastante uniformes en todos los animales, mientras que los niveles de $A\beta_{1-40}$ en LCR fueron muy variables. Por lo tanto, todas las mediciones de $A\beta_{1-40}$ se normalizaron con respecto a la línea basal para cada mono individual.

Estos datos muestran que una sola dosis de YW412.8.31 en el mono reduce significativamente los niveles de $A\beta$ en plasma y LCR. En el LCR, se observaron concentraciones de YW412.8.31 de 0,2-0,3 $\mu\text{g/ml}$ durante este período de tiempo, lo que se traduce en ~2 nM (Figura 20, panel B). De estos datos, se infiere que las concentraciones cerebrales de YW412.8.31 están en un intervalo similar. Comparando los datos de PK y de PD, estos resultados muestran que la exposición al fármaco en el plasma es suficiente para inhibir al máximo la producción de $A\beta$ en una franja de 7 días, mientras que las concentraciones de fármaco en el LCR se aproximan a la CI_{50} celular y reducen los niveles de $A\beta$ en el cerebro de forma transitoria al nivel de dosis ensayado (30 mg/kg). En resumen, estos datos proporcionan una evidencia consistente de que el anti-BACE1 administrado sistémicamente puede reducir la actividad de BACE1 en el cerebro, según lo determinado mediante las mediciones de $A\beta$ en el LCR, en un primate no humano.

EJEMPLO 6: MADURACIÓN DE AFINIDAD DEL ANTICUERPO YW412.8.31

El anticuerpo YW412.8.31 era de afinidad madurada según los datos estructurales proporcionados por la estructura cristalina que se ha descrito previamente. Se mutaron los restos de anticuerpos en contacto con BACE1 con el fin de mejorar la afinidad del anticuerpo YW412.8.31. Los clones de afinidad madurada producidos mediante esta estrategia tienen la nomenclatura de YW412.8.3xS. También se produjeron clones de afinidad madurada de YW412.8.31 a través de la dirección de aleatorización en condiciones suaves de todas las CDR, como se ha descrito

anteriormente, y recibieron la nomenclatura YW412.8.31x. En las Figuras 23(A)-(C) y 24(A)-(C), se representan las secuencias variables de cadena pesada y las secuencias variables de cadena ligera de los clones que se unieron a BACE1.

5 Los clones que se unieron a BACE1 se ensayaron para determinar la inhibición de la proteasa BACE1 en un ensayo de HTRF basado en células como se ha descrito previamente en el Ejemplo 2C. Los resultados del ensayo se representan en las Figuras 25A y 25B. La Figura 25B muestra los resultados de la producción de A β ₁₋₄₀ (pg/ml) de las neuronas corticales primarias tratadas durante 24 horas con diversos anticuerpos anti-BACE1 de afinidad
10 madurada a las concentraciones indicadas. Varios de los anticuerpos ensayados inhibieron BACE1 a un nivel similar al observado con YW412.8.31.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> GENENTECH, INC. *ET AL.*

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA INMUNOTERAPIA DE ENFERMEDADES NEURONALES

<130> P4453R1-WO

20 <140>
<141>

<150> 61/426.425
<151> 22-12-2010

25 <150> 61/418.850
<151> 01-12-2010

30 <150> 61/418.310
<151> 30-11-2010

<150> 61/456.642
<151> 10-11-2010

35 <160> 210

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 1

ES 2 607 086 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

- <210> 2
- <211> 108
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <221> fuente
- 10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

- <400> 2

ES 2 607 086 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

ES 2 607 086 T3

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

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

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

ES 2 607 086 T3

<400> 5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Val Ala Asn Ser
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 6
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

15 <400> 6

ES 2 607 086 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 <400> 7

15 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

20 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25 <400> 8

Arg Ala Ser Gln Val Val Ala Asn Ser Leu Ala
 1 5 10

30 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

ES 2 607 086 T3

<400> 9

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

5 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

15 <400> 10

Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

20 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 11

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

30 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

40 <400> 12

Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr
1 5

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

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 13

Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro Pro Thr
1 5

55 <210> 14

ES 2 607 086 T3

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

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

10 <400> 14

Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr Thr

1 5

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

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

20 <400> 15

Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro Thr
 1 5

25 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

35 <400> 16

Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro Thr
 1 5

40 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar = "val"

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /nota = "el resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "Ala"
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar = "Asn"
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazar = "Ala"
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar = "Leu"
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(10)
 <223> /nota = "Los restos proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"
 25
 <400> 17

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ser	Val	Ala
1				5					10	

 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "Leu"
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /nota = "el resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"
 50
 <400> 18

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
1				5		

 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 60

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar = "Phe" o "Gly" o "Asp" o "Tyr"

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar = "Pro" o "Ser" o "Ala"

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "Asn"

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar = "Tyr" o "Asp" o "Ser"

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "Leu"

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar = "Thr"

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(8)
<223> /nota = "Los restos proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

40 <400> 19

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

45 <210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 20

ES 2 607 086 T3

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

- <210> 21
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
- <400> 21

ES 2 607 086 T3

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
 1 5 10

15 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25 <400> 23

Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
 1 5 10

<210> 24

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

10

<400> 24

Gly	Trp	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5					10					15	

Lys Gly

15

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 25

Gly	Pro	Phe	Ser	Pro	Trp	Val	Met	Asp	Tyr
1				5					10

25

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar = "Leu"

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar = "Gly"

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

55

<400> 26

ES 2 607 086 T3

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
 1 5 10

5 <210> 27
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
 <400> 27

Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
 20 25 30

Tyr Tyr Ser Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala
 50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly
 100 105 110

Tyr Lys Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

15 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25 <400> 28

Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile His
 1 5 10

ES 2 607 086 T3

<210> 29
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
10
<400> 29

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

Lys Gly

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
15
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
20
<400> 30

Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr
25
<210> 31
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
30
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
35
<400> 31

ES 2 607 086 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 32
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

ES 2 607 086 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

- <210> 34
- <211> 108
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- 10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
- <400> 34

ES 2 607 086 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 35

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
 1 5 10

15 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25 <400> 36

Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
 1 5

30 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 607 086 T3

<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

5 <400> 37

Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser
1 5

10 <210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
<400> 38

20 **Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser**
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
30 <400> 39

Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

35 <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
<400> 40

45 **Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr**
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"
55 <220>
<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "Trp" o "Tyr"

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar = "Trp"

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

20 <400> 41

Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
 1 5

25 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar = "Asp" o "Val"

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "Ala"

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar = "Thr" o "Asn"

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazar = "Ser"

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar = "Leu"

ES 2 607 086 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(10)
5 <223> /nota = "Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 42

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
1 5 10

10 <210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar = "Trp" o "Tyr" o "Leu"

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar = "Ser" o "Trp"

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

40 <400> 43

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

45 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar = "Phe" o "Gly" o "Asp" o "Tyr"

60 <220>
<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar = "Pro" o "Ser" o "Ala"

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar = "Thr" o "Asn"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar = "Tyr" o "Asp" o "Ser"

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "Leu"

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar = "Pro" o "Thr"

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> /nota = "Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

30 <400> 44

Gln Gln Ser Tyr Tyr Thr Pro Phe Thr
1 5

35 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar-"Thr"

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar = "Leu" o "Tyr"

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar = "Tyr"

5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "Ser"

10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar = "Gly" o "Ser"

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(8)
 <223> /nota = "Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"
 <400> 45

Gly	Phe	Asn	Phe	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ile	His
1				5					10

20
 <210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "Gly"

35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /reemplazar = "Ser"

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /nota = "Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar="Tyr"

50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "Ser"

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> /nota="Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

60
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)

<223> /reemplazar-"Tyr"
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (9)..(9)
 <223> /nota-"El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /reemplazar-"Ser"
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> /nota-"El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"
 20 <400> 46

Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1			5					10						15	

Lys	Gly
-----	-----

 <210> 47
 25 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"
 <220>
 35 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "Gly"
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"
 <220>
 45 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar = "Phe"
 <220>
 50 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar = "Ser"
 <220>
 55 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar = "Pro"
 <220>
 60 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "Trp"
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "val"
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (8)..(14)
 <223> /reemplazar = " "
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (3)..(14)
 <223> /nota = "Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (8)..(14)
 <223> /nota = "Cuando está presente, esta región está presente en su totalidad"
 <400> 47
 25
 Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 48
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 35 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 <400> 48
 Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala
 1 5
 40
 <210> 49
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 49

ES 2 607 086 T3

Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
 1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
 20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
 35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
 65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
 100 105 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
 115 120 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
 130 135 140

ES 2 607 086 T3

Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile
 145 150 155 160

Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp
 165 170 175

Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Pro Asp Asp
 180 185 190

Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr His Val Pro
 195 200 205

Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln
 210 215 220

Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile
 225 230 235 240

Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg
 245 250 255

Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln
 260 265 270

Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val
 275 280 285

Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala
 290 295 300

Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp
 305 310 315 320

Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr
 325 330 335

Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val
 340 345 350

Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg
 355 360 365

Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala
 370 375 380

Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu

ES 2 607 086 T3

Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
 1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
 20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
 35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
 65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
 100 105 110

ES 2 607 086 T3

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
 115 120 125
 Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
 130 135 140
 Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile
 145 150 155 160
 Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp
 165 170 175
 Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Leu Cys Gly
 180 185 190
 Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly
 195 200 205
 Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu
 210 215 220
 Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val
 225 230 235 240
 Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr
 245 250 255
 Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu
 260 265 270
 Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser
 275 280 285
 Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val
 290 295 300
 Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser
 305 310 315 320
 Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile
 325 330 335
 Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln
 340 345 350
 Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val

ES 2 607 086 T3

	355					360					365				
Met	Gly	Ala	Val	Ile	Met	Glu	Gly	Phe	Tyr	Val	Val	Phe	Asp	Arg	Ala
	370					375					380				
Arg	Lys	Arg	Ile	Gly	Phe	Ala	Val	Ser	Ala	Cys	His	Val	His	Asp	Glu
385					390					395					400
Phe	Arg	Thr	Ala	Ala	Val	Glu	Gly	Pro	Phe	Val	Thr	Leu	Asp	Met	Glu
				405					410					415	
Asp	Cys	Gly	Tyr	Asn	Ile	Pro	Gln	Thr	Asp	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Thr
			420					425					430		
Ile	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Ala	Ile	Cys	Ala	Leu	Phe	Met	Leu	Pro	Leu
		435					440					445			
Cys	Leu	Met	Val	Cys	Gln	Trp	Cys	Cys	Leu	Arg	Cys	Leu	Arg	Gln	Gln
	450					455					460				
His	Asp	Asp	Phe	Ala	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys				
465					470					475					

<210> 51
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 51

ES 2 607 086 T3

Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
 1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
 20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
 35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
 65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
 100 105 110

ES 2 607 086 T3

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
 115 120 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
 130 135 140

Leu Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln
 145 150 155 160

Thr His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe
 165 170 175

Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile
 180 185 190

Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr
 195 200 205

Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu
 210 215 220

Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp
 225 230 235 240

Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys
 245 250 255

Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu
 260 265 270

Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln
 275 280 285

Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu
 290 295 300

Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln
 305 310 315 320

Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys
 325 330 335

Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala
 340 345 350

Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg

ES 2 607 086 T3

Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
 1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
 20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
 35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
 65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
 100 105 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
 115 120 125

ES 2 607 086 T3

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
 130 135 140

Leu Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala
 145 150 155 160

Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr
 165 170 175

Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu
 180 185 190

Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp
 195 200 205

Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr
 210 215 220

Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile
 225 230 235 240

Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly
 245 250 255

Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe
 260 265 270

Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe
 275 280 285

Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val
 290 295 300

Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser
 305 310 315 320

Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val
 325 330 335

Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His
 340 345 350

Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr
 355 360 365

Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser

ES 2 607 086 T3

370

375

380

Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe
385 390 395 400

Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys
405 410 415

Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
420 425 430

5 <210> 53
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Biotina N terminal"

<400> 53

Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg His
1 5 10 15

Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
20 25

20 <210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Rh N terminal"

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Inactivador C terminal"

<400> 54

Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Lys
1 5

40 <210> 55
<211> 18
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
5 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota = "FAM N terminal"

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "CONH2 C-terminal"

15 <400> 55

Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg Trp
1 5 10 15

Lys Lys

<210> 56
20 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
30 <221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar = "Phe"

<220>
35 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
40 <221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar = "Tyr"

<220>
45 <221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "Arg"

<220>
50 <221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> /nota = " El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición "

<220>
55 <221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "Pro" o "Arg" o "Lys" o "Trp"

60 <220>

ES 2 607 086 T3

<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

5

<400> 56

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

10

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

20

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "Gln" o "Ser" o "Lys"

25

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

30

<400> 57

Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr
1 5

35

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 58

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser
1 5

45

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

55

<400> 59

ES 2 607 086 T3

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro
1 5

5
<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 60

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Arg
1 5

15
<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25
<400> 61

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Lys
1 5

30
<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 62

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Trp
1 5

40
<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

50
<400> 63

Phe Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

ES 2 607 086 T3

5 <210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

10 <400> 64

Phe Ala Ser Phe Arg Tyr Ser
1 5

15 <210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

20 <400> 65

Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro Thr
1 5

25 <210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

30 <400> 66

Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro Thr
1 5

35 <210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

40 <400> 67

Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro Thr
1 5

45 <210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <400> 68

<223> /reemplazar = "Lys" o "Leu"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar = "Tyr"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> /nota = "Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 69

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar = "Tyr"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 70

Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 71

Gly Phe Phe Phe Gln Gly Tyr Gly Ile His
 1 5 10

<210> 72
 <211> 10

ES 2 607 086 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 72

10 Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

15 <210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 73

25 Gly Tyr Thr Tyr Ile Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

30 <210> 74
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 74

35 Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

40 <210> 75
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 75

50 Gly Trp Ile Ser Pro Gln Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

50 <210> 76

ES 2 607 086 T3

<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

10 <400> 76

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

Lys Gly

<210> 77
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

20 <400> 77

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Leu Tyr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

25 <210> 78
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

35 <400> 78

Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

40 <210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 79

ES 2 607 086 T3

Gly Pro Phe Tyr Pro Trp Val Met Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 80
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 80

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 81
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

25 <400> 81

ES 2 607 086 T3

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

- <210> 82
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
- <400> 82

ES 2 607 086 T3

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 83
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10

<400> 83

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

ES 2 607 086 T3

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 84
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
 <400> 84

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 85
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

ES 2 607 086 T3

<400> 85

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 86
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

15 <400> 86

ES 2 607 086 T3

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 87
- <211> 119
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- 10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
- <400> 87

ES 2 607 086 T3

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

- <210> 88
- <211> 119
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- 10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
- <400> 88

ES 2 607 086 T3

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 90

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 607 086 T3

<210> 91
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10

<400> 91

```

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

15

<210> 92
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 92

ES 2 607 086 T3

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

- <210> 93
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
- <400> 93

ES 2 607 086 T3

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 95
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 95

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

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

ES 2 607 086 T3

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Leu Tyr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Tyr Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 96

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 96

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 97
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 97

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

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

25 <400> 98

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

ES 2 607 086 T3

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 99

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 99

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

ES 2 607 086 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 100
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 100

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

15 <210> 101
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

25 <400> 101

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

ES 2 607 086 T3

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 102
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
 <400> 102

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

15 <210> 103
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 607 086 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

5 <400> 103

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
          20           25           30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105
    
```

10 <210> 104
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
 <400> 104

ES 2 607 086 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 106
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10

<400> 106

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

ES 2 607 086 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 107
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10

<400> 107

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

15

ES 2 607 086 T3

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

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10

<400> 108

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
           20           25           30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
           85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100          105
    
```

<210> 109
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

20

<400> 109

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
           20           25           30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
    
```

25

ES 2 607 086 T3

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 110
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"
 <400> 110

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

15 <210> 111
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

ES 2 607 086 T3

<400> 111

```

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

```

5

<210> 112
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

15

<400> 112

ES 2 607 086 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Trp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 114

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 114

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

ES 2 607 086 T3

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10 <400> 116

```

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

  Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
           20           25           30

  Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

  Tyr Phe Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

  Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65           70           75           80

  Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
           85           90           95

  Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100          105
  
```

15 <210> 117
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 117

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
           20           25           30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

Tyr Phe Ala Ser Phe Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
           85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100          105

```

- 5 <210> 118
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)..(1)
- <223> /reemplazar="Trp" o "Tyr" o "Phe" o "Leu"

- 20 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)..(4)
- <223> /reemplazar = "Ser" o "Tyr" o "Trp"

- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (5)..(5)
- <223> /reemplazar = "Arg"

- 35 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (4)..(5)
- <223> /nota = "Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "Pro" o "Arg" o "Lys" o "Trp"

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 118

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

15
 <210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar = "Phe" o "Gly" o "Asp" o "Tyr"

30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar = "Pro" o "Ser" o "Ala"

35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar = "Thr" o "Asn"

40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar = "Tyr" o "Asp" o "Ser"

45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "Gln" o "Ser" o "Lys" o "Leu"

50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar = "Pro" o "Thr"

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> /nota = "Los restos proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

60
 <400> 119

ES 2 607 086 T3

Gln Gln Ser Tyr Tyr Thr Pro Phe Thr
1 5

5 <210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
15 <223> /reemplazar = "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
20 <223> /reemplazar = "Asn" o "Thr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
25 <223> /reemplazar = "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
30 <223> /reemplazar = "Gln" o "Ile" o "Ser" o "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
35 <223> /reemplazar = "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
40 <223> /reemplazar = "Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
45 <223> /reemplazar = "Gly" o "Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(8)
50 <223> /nota = " El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición "

<400> 120

Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr Ala Ile His
1 5 10

55 <210> 121
<211> 18
<212> PRT
60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "Gly"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /reemplazar = "Ser"

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /nota = "Nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar = "Ser" o "Gln" o "Tyr"

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "Ser"

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazar = "Lys" o "Leu" o "Tyr"

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar = "Tyr"

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /reemplazar = "Ser"

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(11)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

55 <400> 121

Ala Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

60 <210> 122

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "Gly"

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar = "Phe"

25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar = "Tyr" o "Ser"

30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar = "Pro"

35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar = "Trp"

40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar="Val"

45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(14)
 <223> /reemplazar = " "

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(14)
 <223> /nota = "El resto proporcionado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(14)
 <223> /nota = "Cuando está presente, esta región está presente en su totalidad"

60

<400> 122

ES 2 607 086 T3

Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp

1 5 10 15

Tyr

5 <210> 123
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 123

Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe
 20 25 30

10 <210> 124
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 124

Ala Ser Leu Ile Pro Glu Phe Ser Asp Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Cys Trp Thr Asn Ser Glu Thr Pro Trp Ser Tyr Phe
 20 25 30

20 <210> 125
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 125

Val Pro Leu Thr Gln Gly Glu Tyr Met Ile Pro Cys Glu Lys Val Ser
 1 5 10 15

Thr Leu

30 <210> 126
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 126

Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val
 1 5 10

40 <210> 127
 <211> 4

ES 2 607 086 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 127

Glu Lys Phe Pro
1

10

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 128

20

Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala
1 5

25

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 129

35

Pro Phe Ser Pro Trp
1 5

40

<210> 130
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

40

Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr
1 5 10

45

<210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

50

Met Gly Ala Gly Leu Asn Tyr Glu Cys Tyr
1 5 10

55

ES 2 607 086 T3

5 <210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 132

Ser Gln Ala Gly Lys Thr Leu Cys Leu
 1 5

10 <210> 133
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

20 <400> 133

Ser Val Ser Ser Ala Val
 1 5

25 <210> 134
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 134

Tyr Ser Ala Ser Ser
 1 5

35 <210> 135
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

45 <400> 135

Tyr Ser Ser Ser Tyr Ser Pro Val
 1 5

50 <210> 136
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 136

ES 2 607 086 T3

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu
1 5

5 <210> 137
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 137

Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Ile
1 5

15 <210> 138
<211> 6
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25 <400> 138

Ser Ser Ser Ser Leu Phe
1 5

30 <210> 139
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 139

Tyr Tyr Tyr Ser Leu Phe
1 5

40 <210> 140
<211> 8
<212> PRT
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

50 <400> 140

Ser Tyr Tyr Ser Tyr Ser Leu Val
1 5

55 <210> 141

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

10 <400> 141

Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Pro Ile
1 5

15 <210> 142
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 142

Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Pro Leu
1 5

25 <210> 143
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

35 <400> 143

Ser Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Ile
1 5

40 <210> 144
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 144

50 **Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Val**
1 5

55 <210> 145
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente

ES 2 607 086 T3

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 145

5 Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
1 5

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 146

Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Pro Ile
1 5

20 <210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 147

30

Tyr Ser Tyr Tyr Ser Leu Phe
1 5

<210> 148

<211> 7

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

40 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 148

Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Val
1 5

45

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

55 <400> 149

ES 2 607 086 T3

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Pro Phe
1 5

5
<210> 150
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 150

Ser Tyr Ser Tyr Pro Val
1 5

15
<210> 151
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25 <400> 151

Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Leu Leu
1 5

30
<210> 152
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 152

Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu
1 5

40
<210> 153
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

50 <400> 153

Phe Tyr Ser Ser Tyr Ile
1 5

55 <210> 154

ES 2 607 086 T3

<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

10 <400> 154

Ile Tyr Tyr Ser Ser Met
1 5

15 <210> 155
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 155

Phe Tyr Tyr Tyr Ser Met
1 5

25 <210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

35 <400> 156

Ile Tyr Ser Tyr Ser Met
1 5

40 <210> 157
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 157

50 **Leu Ser Tyr Ser Tyr Ile**
1 5

55 <210> 158
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 607 086 T3

<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 158

5

Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile
1 5

<210> 159
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

15

<400> 159

Phe Ser Ser Tyr Tyr Ile
1 5

20

<210> 160
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

30

<400> 160

Val Ser Tyr Tyr Tyr Ile
1 5

35

<210> 161
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 161

Val Ser Ser Ser Tyr Met
1 5

45

<210> 162
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

55

<400> 162

ES 2 607 086 T3

Val Ser Ser Ser Ser Met
1 5

5 <210> 163
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 <400> 163

Phe Tyr Tyr Ser Tyr Met
1 5

15 <210> 164
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 25 <400> 164

Phe Tyr Ser Tyr Ser Met
1 5

30 <210> 165
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 <400> 165

Leu Tyr Tyr Ser Ser Ile
1 5

40 <210> 166
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 50 <400> 166

Val Ser Ser Ser Tyr Ile
1 5

55 <210> 167
 <211> 6

ES 2 607 086 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 167

10 **Val Tyr Tyr Ser Tyr Met**
1 5

15 <210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 168

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5 10

25 <210> 169
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 169

35 **Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr**
1 5 10

40 <210> 170
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 170

50 **Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr**
1 5 10

55 <210> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

ES 2 607 086 T3

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 171

5 **Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser**
 1 5 10

<210> 172

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

15 <400> 172

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Gly Ser Thr Tyr
 1 5 10

20 <210> 173

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

30 <400> 173

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser
 1 5 10

35 <210> 174

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

40 <400> 174

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser
 1 5 10

45 <210> 175

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

55 <400> 175

ES 2 607 086 T3

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser
1 5 10

5
 <210> 176
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 176

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
1 5 10

15
 <210> 177
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25
 <400> 177

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Ser Thr Tyr
1 5 10

30
 <210> 178
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 178

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Ser
1 5 10

40
 <210> 179
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

50
 <400> 179

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr
1 5 10

ES 2 607 086 T3

5
 <210> 180
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

10
 <400> 180

Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Gly Tyr Thr Ser
 1 5 10

15
 <210> 181
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 181

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Tyr Thr Tyr
 1 5 10

25
 <210> 182
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

35
 <400> 182

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser
 1 5 10

40
 <210> 183
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

50
 <400> 183

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Tyr
 1 5 10

55
 <210> 184
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 607 086 T3

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 184

5

Arg Ser Ser Ser Tyr Lys Ile Ser Gly Tyr Glu Leu Met Tyr Tyr Glu
 1 5 10 15
 Tyr Ala Met Asp
 20

<210> 185
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

15

<400> 185

Arg Asp Gly Met Tyr Tyr Arg Gly Phe Asp
 1 5 10

20

<210> 186
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

30

<400> 186

Arg Asn Ser Tyr Gly Tyr Arg Ala Leu Asp
 1 5 10

35

<210> 187
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 187

Arg Ala Tyr Ser Met Tyr Pro Trp Asn Val Gly Phe Asp
 1 5 10

45

<210> 188
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

5 <400> 188

Arg Ser Tyr His His Ser Asp Lys Tyr Tyr Tyr Ala Trp Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

Leu Asp

10 <210> 189
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 189

20 **Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Gly Ile Asp**
 1 5 10

25 <210> 190
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 190

Arg Lys Ser Asn Arg Tyr Ser Arg Val Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10

35 <210> 191
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 191

45 **Arg Ile Gly Ser Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Val His Tyr Asn**
 1 5 10 15

Gly Met Asp

50 <210> 192
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

5 <400> 192

Arg Tyr Gly Tyr Ser Gly Lys Gly Phe Asp
 1 5 10

10 <210> 193
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 <400> 193

20 **Arg Pro Asn Arg Tyr Gly Leu Val Gly Ser Gly Leu Asp**
 1 5 10

25 <210> 194
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 <400> 194

35 **Arg Lys Ser Asn Arg Tyr Ser Arg Val Ser Phe Gly Met Asp**
 1 5 10

40 <210> 195
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
 <400> 195

Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met
 1 5 10 15

Asp

50 <210> 196
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente

ES 2 607 086 T3

Arg Tyr Phe Trp Ser Tyr Asn Ser Phe Ala Gln Ser Phe Trp Ala Met
1 5 10 15

Asp

5 <210> 201
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 201

Arg Ser Gln Thr Thr Asp Tyr Leu Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly
1 5 10 15

Ala Leu Asp

15 <210> 202
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"
25 <400> 202

Arg Tyr Gly Phe Tyr Tyr Ser Tyr Glu Tyr Ala Phe Asp
1 5 10

30 <210> 203
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 203

Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Val
1 5

40 <210> 204
<211> 5
<212> PRT
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 204

ES 2 607 086 T3

Ser Trp Ala Ser Trp
1 5

5 <210> 205
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 205

Trp Tyr Ala Ser Trp
1 5

15 <210> 206
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

25 <400> 206

Trp Trp Ala Ser Ser
1 5

30 <210> 207
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 207

Ser Tyr Ala Ser Tyr
1 5

40 <210> 208
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

50 <400> 208

Tyr Ser Tyr Ser Leu Leu
1 5

55 <210> 209

<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

10 <400> 209

Tyr Tyr Pro Leu
1

15 <210> 210
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Etiqueta sintética de 6 histidinas"

<400> 210

His His His His His His
1 5

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento del mismo, que se une a BACE1, anticuerpo que reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - una secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO: 22 o 23, una secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO: 24 y una secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO: 25; y
 - una secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; una secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; y una secuencia de HVR-L3 seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 11-16.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la secuencia de HVR-H1 es SEQ ID NO: 23.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 21, 27 y 80-98.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena VH es SEQ ID NO: 21.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la secuencia de HVR-L1 es SEQ ID NO: 7, la secuencia de HVR-L2 es SEQ ID NO: 9 y la secuencia de HVR-L3 es SEQ ID NO: 12.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de la cadena VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1-6, 31-34 y 99-117.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena VL es SEQ ID NO: 2.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, que comprende además una cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que es un anticuerpo monoclonal.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que es un fragmento de anticuerpo.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.
13. Ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
14. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Un método de producción de un anticuerpo de las reivindicaciones 1-12 que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 14 de manera que se produzca el anticuerpo.
16. Un inmunoc conjugado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un agente citotóxico.
17. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso como un medicamento.
19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), encefalopatía espongiiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker y caquexia crónica.
20. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en la reducción y/o inhibición de la producción de proteína amiloide- β (A β).

n.º de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
YW412.8	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A							
YW412.8.31	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A							
YW412.8.30	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A							
YW412.8.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A							
YW412.8.29	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A							
YW412.8.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A							
n.º de Kabat	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78						
											Kabat - CDR H2																																				
											Chothia - CDR H2																																				
											Contacto - CDR H2																																				
YW412.8	P	G	K	G	L	E	W	V	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.31	P	G	K	G	L	E	W	V	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.30	P	G	K	G	L	E	W	V	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.2	P	G	K	G	L	E	W	V	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.29	P	G	K	G	L	E	W	V	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	X	N	T	A							
YW412.8.51	P	G	K	G	L	E	W	V	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
n.º de Kabat	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
											Kabat - CDR H3																																				
											Chothia - CDR H3																																				
											Contacto - CDR H3																																				
YW412.8	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20						
YW412.8.31	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	21						
YW412.8.30	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20						
YW412.8.2	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20						
YW412.8.29	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20						
YW412.8.51	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20						

FIG. 1B

n.º de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Fab12	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	W	Y	Q						
LC6 IgG	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	W	Y	Q						
LC9 IgG	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	W	Y	Q						
LC10 IgG	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	W	Y	Q						

n.º de Kabat	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Fab12	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	S	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
LC6 IgG	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	S	W	A	S	W	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
LC9 IgG	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	W	Y	A	S	W	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
LC10 IgG	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	W	W	A	S	S	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

n.º de Kabat	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
Fab12	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	Y	S	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO: 31)
LC6 IgG	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	Y	S	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO: 32)
LC9 IgG	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	Y	S	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO: 33)
LC10 IgG	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	S	Y	S	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO: 34)

FIG. 2A

FabID	CDRH1	CDRL3	CDRL2	CDRL1
Fab1	33 I 32 Y S 31 S S 30 S Y 29 Y Y 28 F I	96 V 95 P 94b S 94a Y Y 94 S S 93 S S 92 S Y 91 Y S	53 S 52 S 51 A 50 S 49 Y	33 V 32 A 31 S 30 S 29 V 28 S
Fab2	M M S S S S Y Y Y Y	L I L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab3	M M S S S S Y Y Y Y	L I L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab4	M M S S S S Y Y Y Y	L I L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab5	I I Y Y S S Y Y Y Y	L F L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab6	I I Y Y S S Y Y Y Y	L F L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab7	I I Y Y S S Y Y Y Y	L F L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab8	I I Y Y S S Y Y Y Y	L F L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab9	I I Y Y S S Y Y Y Y	L F L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab10	M M Y Y S S S S S S	L V L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab11	I I Y Y S S Y Y Y Y	L I L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab12	I I S S S S S S S S	L I L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab14	M M S S S S S S S S	L I L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab19	M M Y Y S S S S S S	L F L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab23	M M Y Y S S S S S S	L V L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab24	M M S S S S S S S S	L V L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab27	I I Y Y S S S S S S	L V L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab32	I I Y Y S S S S S S	L L L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V
Fab47	M M Y Y S S S S S S	L L L L L L L L L L	S S S S A A S S Y Y	V V A A S S S S V V

FIG. 3A

FabID	101	100l	100k	100j	100i	100h	100g	100f	100e	100d	100c	100b	100a	100	99	98	97	96	95	94
Fab1	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab2	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab3	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab4	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab5	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab6	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab7	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab8	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab9	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab10	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab11	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab12	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab14	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab19	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab23	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab24	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab27	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab32	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R
Fab47	D	M	A	Y	E	Y	Y	M	L	E	Y	G	S	I	K	Y	S	S	S	R

FabID	58	57	56	55	54	53	52a	52	51	50
Fab1	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab2	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab3	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab4	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab5	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab6	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab7	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab8	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab9	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab10	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab11	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab12	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab14	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab19	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab23	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab24	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab27	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab32	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S
Fab47	Y	T	S	G	S	Y	P	S	I	S

FIG. 3B

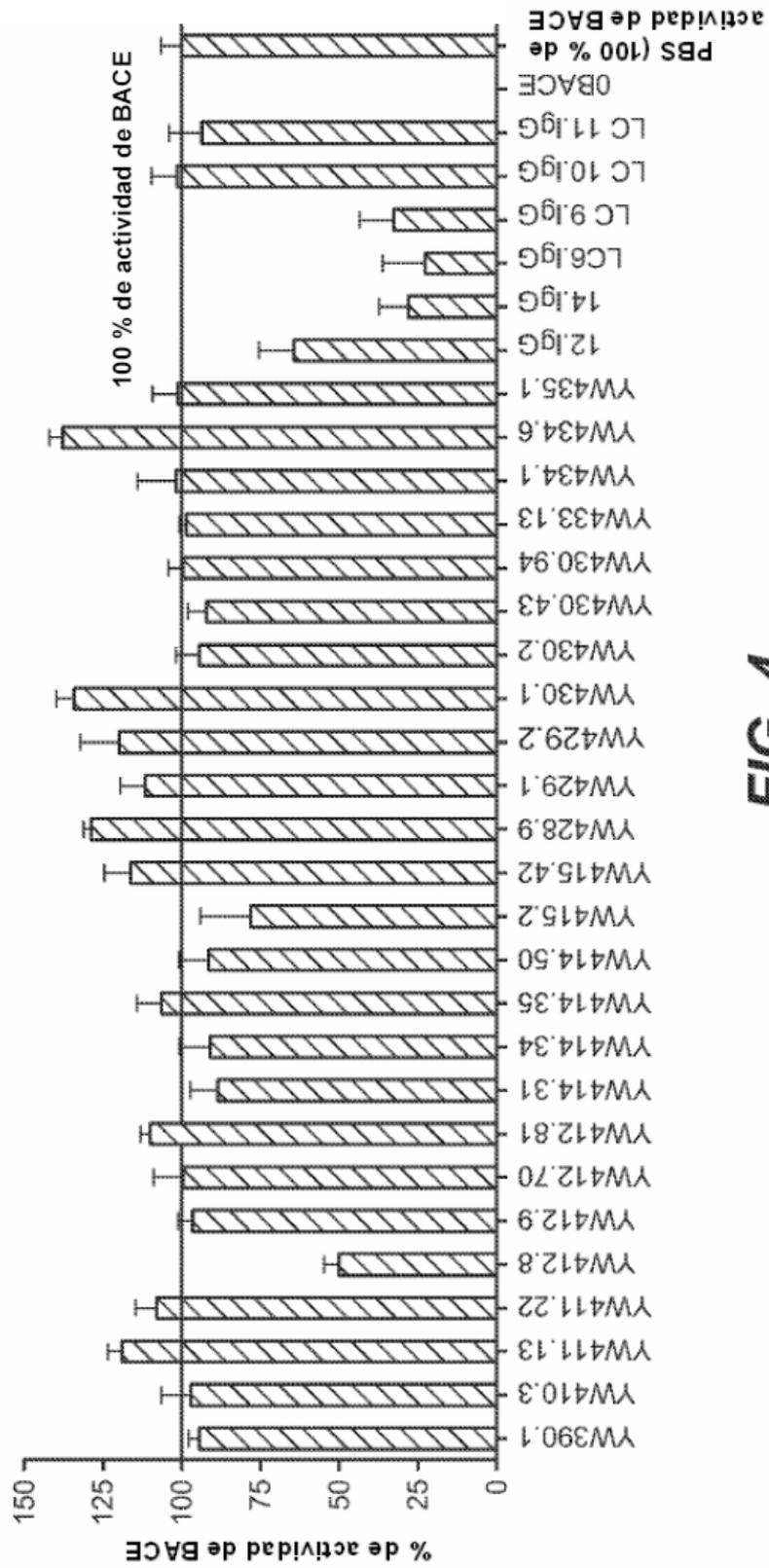


FIG. 4

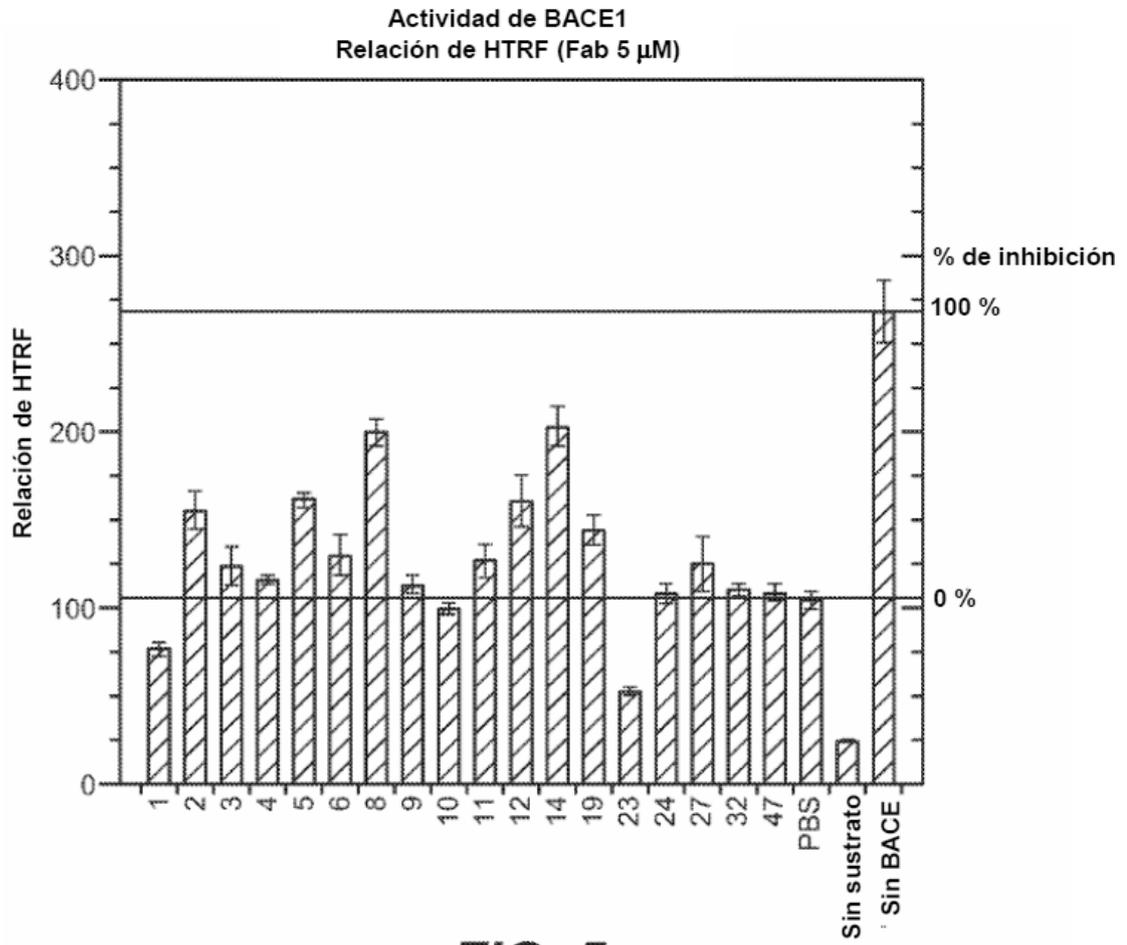


FIG. 5

CDRL1					CDRL2					CDRL3					CDRH1					Relación de ELISA de competición	ID del Fab	Parental					
28	S	V	S	S	49	Y	S	A	S	53	S	S	91	Y	S	Y	96	L	I	28	L	S	Y	28	LC4	Fab5	
29	S	V	S	S	50	Y	S	A	S	52	S	S	92	Y	S	Y	95	L	L	29	L	S	Y	29	LC11	Fab5	
30	S	V	S	S	51	S	A	S	S	53	S	S	93	Y	S	Y	96	L	L	30	Y	S	Y	30	LC6	Fab12	
31	S	V	S	S	52	S	A	S	S	54	S	S	94a				97	P	F	31	S	S	Y	31	LC9	Fab12	
32	S	V	S	S	53	S	A	S	S	55	S	S	94b				98	P	F	32	Y	S	Y	32	LC10	Fab12	
33	S	V	S	S	54	S	A	S	S	56	S	S	94c				99	P	F	33	I	I	I	33	LC40	Fab14	
33a					55	S	A	S	S	57	S	S	94d				100	P	F								
					56	S	A	S	S	58	S	S	94e				100a	Y	A								
					57	S	A	S	S	59	S	S	94f				100b	Y	A								
					58	S	A	S	S	60	S	S	94g				100c	Y	A								
					59	S	A	S	S	61	S	S	94h				100d	Y	A								
					60	S	A	S	S	62	S	S	94i				100e	Y	A								
					61	S	A	S	S	63	S	S	94j				100f	Y	A								
					62	S	A	S	S	64	S	S	94k				100g	Y	A								
					63	S	A	S	S	65	S	S	94l				100h	Y	A								
					64	S	A	S	S	66	S	S	94m				100i	Y	A								
					65	S	A	S	S	67	S	S	94n				100j	Y	A								
					66	S	A	S	S	68	S	S	94o				100k	Y	A								
					67	S	A	S	S	69	S	S	94p				100l	Y	A								
					68	S	A	S	S	70	S	S	94q				100m	Y	A								
					69	S	A	S	S	71	S	S	94r				100n	Y	A								
					70	S	A	S	S	72	S	S	94s				100o	Y	A								
					71	S	A	S	S	73	S	S	94t				100p	Y	A								
					72	S	A	S	S	74	S	S	94u				100q	Y	A								
					73	S	A	S	S	75	S	S	94v				100r	Y	A								
					74	S	A	S	S	76	S	S	94w				100s	Y	A								
					75	S	A	S	S	77	S	S	94x				100t	Y	A								
					76	S	A	S	S	78	S	S	94y				100u	Y	A								
					77	S	A	S	S	79	S	S	94z				100v	Y	A								
					78	S	A	S	S	80	S	S	94aa				100w	Y	A								
					79	S	A	S	S	81	S	S	94ab				100x	Y	A								
					80	S	A	S	S	82	S	S	94ac				100y	Y	A								
					81	S	A	S	S	83	S	S	94ad				100z	Y	A								
					82	S	A	S	S	84	S	S	94ae				100aa	Y	A								
					83	S	A	S	S	85	S	S	94af				100ab	Y	A								
					84	S	A	S	S	86	S	S	94ag				100ac	Y	A								
					85	S	A	S	S	87	S	S	94ah				100ad	Y	A								
					86	S	A	S	S	88	S	S	94ai				100ae	Y	A								
					87	S	A	S	S	89	S	S	94aj				100af	Y	A								
					88	S	A	S	S	90	S	S	94ak				100ag	Y	A								
					89	S	A	S	S	91	S	S	94al				100ah	Y	A								
					90	S	A	S	S	92	S	S	94am				100ai	Y	A								
					91	S	A	S	S	93	S	S	94an				100aj	Y	A								
					92	S	A	S	S	94	S	S	94ao				100ak	Y	A								
					93	S	A	S	S	95	S	S	94ap				100al	Y	A								
					94	S	A	S	S	96	S	S	94aq				100am	Y	A								
					95	S	A	S	S	97	S	S	94ar				100an	Y	A								
					96	S	A	S	S	98	S	S	94as				100ao	Y	A								
					97	S	A	S	S	99	S	S	94at				100ap	Y	A								
					98	S	A	S	S	100	S	S	94au				100aq	Y	A								
					99	S	A	S	S	101	S	S	94av				100ar	Y	A								
					100	S	A	S	S	102	S	S	94aw				100as	Y	A								
					101	S	A	S	S	103	S	S	94ax				100at	Y	A								
					102	S	A	S	S	104	S	S	94ay				100au	Y	A								
					103	S	A	S	S	105	S	S	94az				100av	Y	A								
					104	S	A	S	S	106	S	S	94ba				100aw	Y	A								
					105	S	A	S	S	107	S	S	94bb				100ax	Y	A								
					106	S	A	S	S	108	S	S	94bc				100ay	Y	A								
					107	S	A	S	S	109	S	S	94bd				100az	Y	A								
					108	S	A	S	S	110	S	S	94be				100ba	Y	A								
					109	S	A	S	S	111	S	S	94bf				100bb	Y	A								
					110	S	A	S	S	112	S	S	94bg				100bc	Y	A								
					111	S	A	S	S	113	S	S	94bh				100bd	Y	A								
					112	S	A	S	S	114	S	S	94bi				100be	Y	A								
					113	S	A	S	S	115	S	S	94bj				100bf	Y	A								
					114	S	A	S	S	116	S	S	94bk				100bg	Y	A								
					115	S	A	S	S	117	S	S	94bl				100bh	Y	A								
					116	S	A	S	S	118	S	S	94bm				100bi	Y	A								
					117	S	A	S	S	119	S	S	94bn				100bj	Y	A								
					118	S	A	S	S	120	S	S	94bo				100bk	Y	A								
					119	S	A	S	S	121	S	S	94bp				100bl	Y	A								
					120	S	A	S	S	122	S	S	94bq				100bm	Y	A								
					121	S	A	S	S	123	S	S	94br				100bn	Y	A								
					122	S	A	S	S	124	S	S	94bs				100bo	Y	A								
					123	S	A	S	S	125	S	S	94bt				100bp	Y	A								
					124	S	A	S	S	126	S	S	94bu				100bq	Y	A								
					125	S	A	S	S	127	S	S	94bv				100br	Y	A								
					126	S	A	S	S	128	S	S	94bw				100bs	Y	A								
					127	S	A	S	S	129	S	S	94bx				100bt	Y	A								
					128	S	A	S	S	130	S	S	94by				100bu	Y	A								
					129	S	A	S	S	131	S	S	94bz				100bv	Y	A								
					130	S	A	S	S	132	S	S	94ca				100bw	Y	A								
					131	S	A	S	S	133	S	S	94cb				100bx	Y	A								
					132	S	A	S	S	134	S	S</															

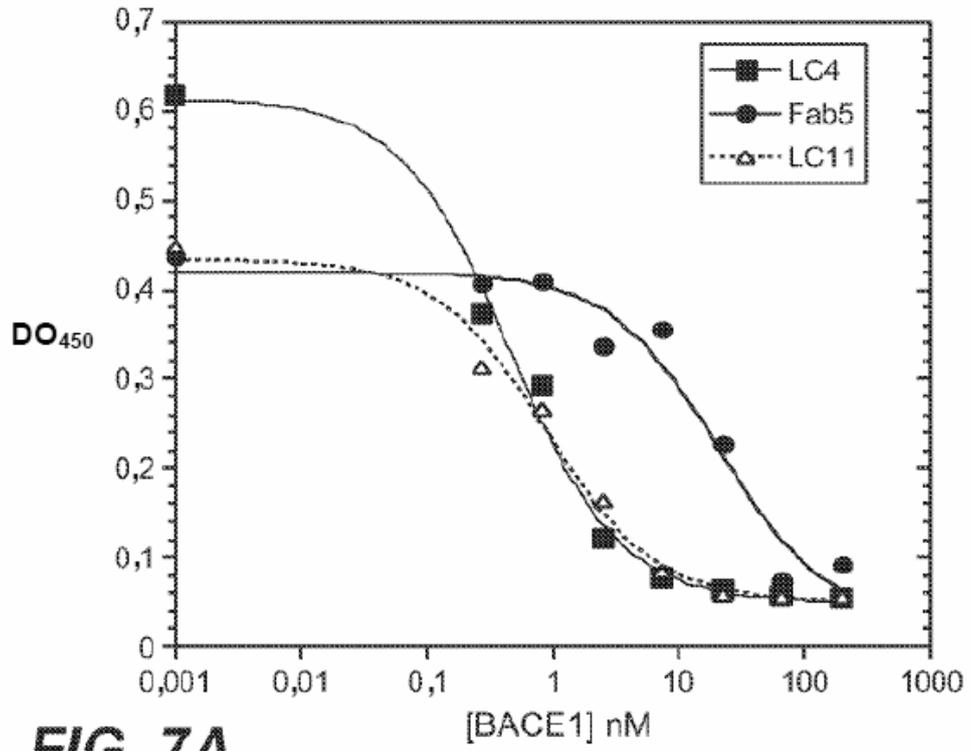


FIG. 7A

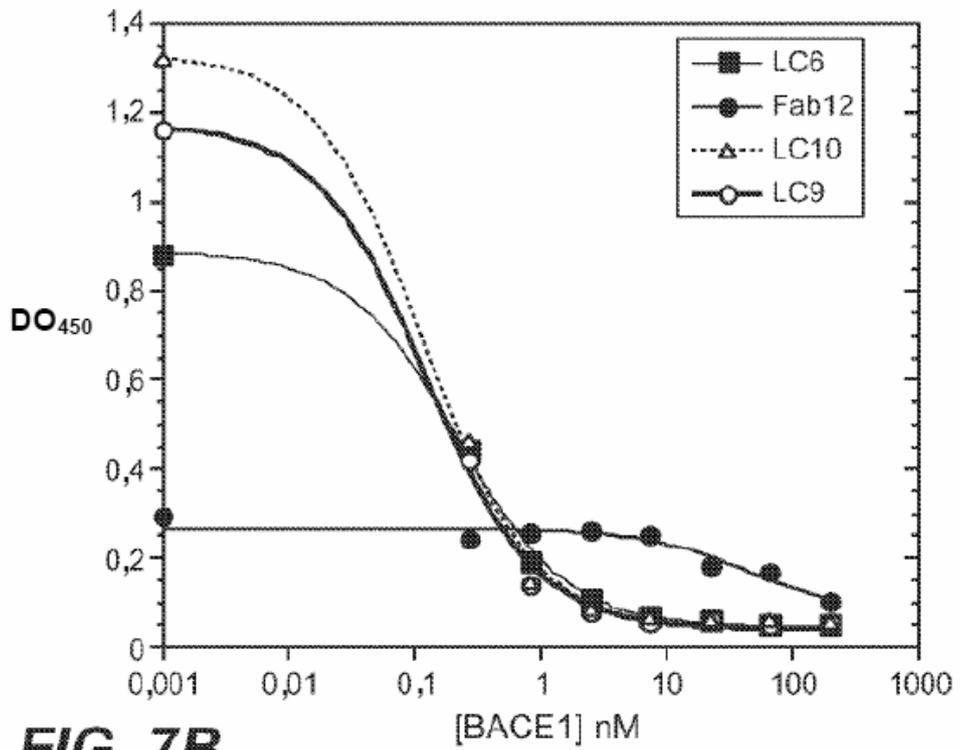


FIG. 7B

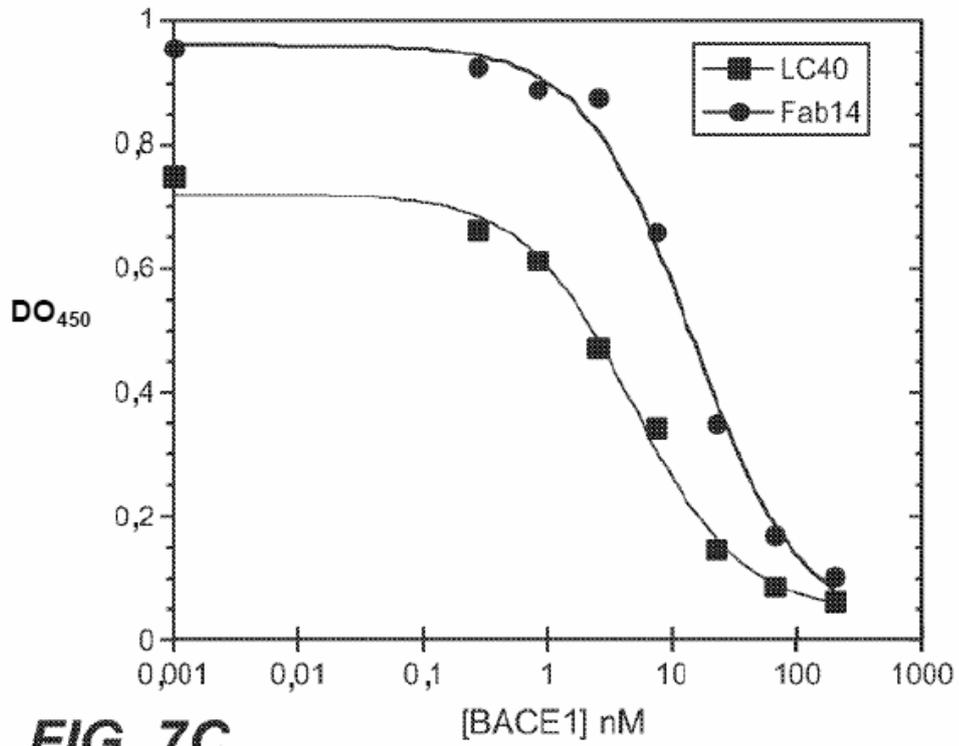


FIG. 7C

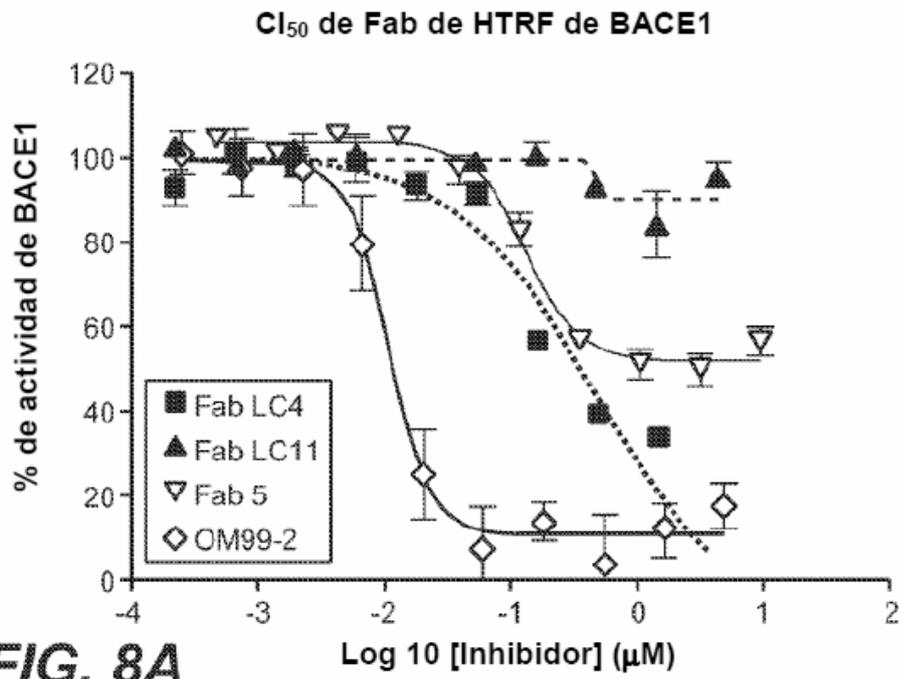
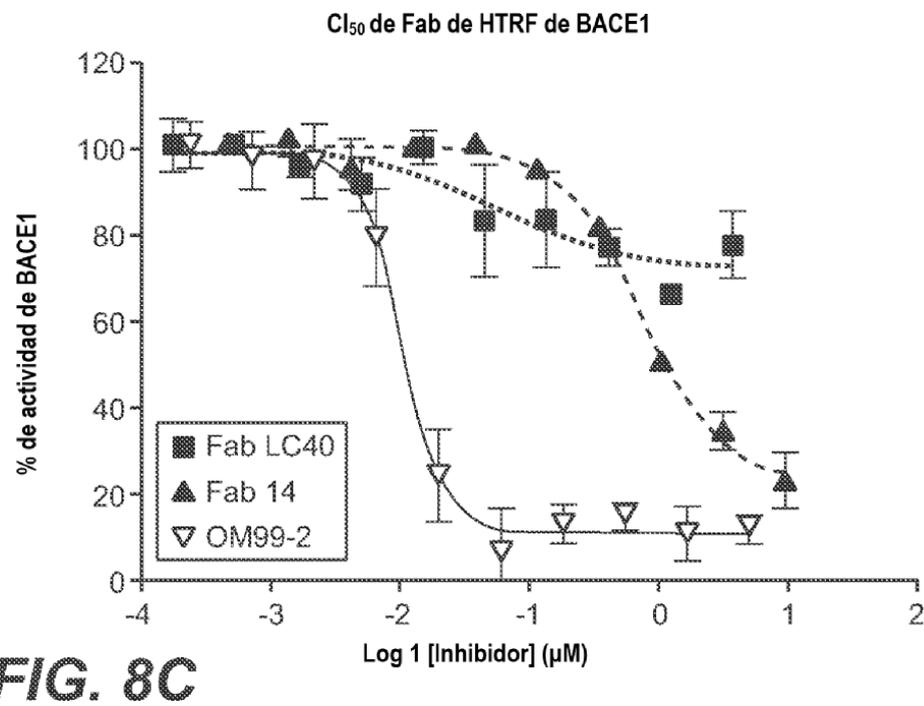
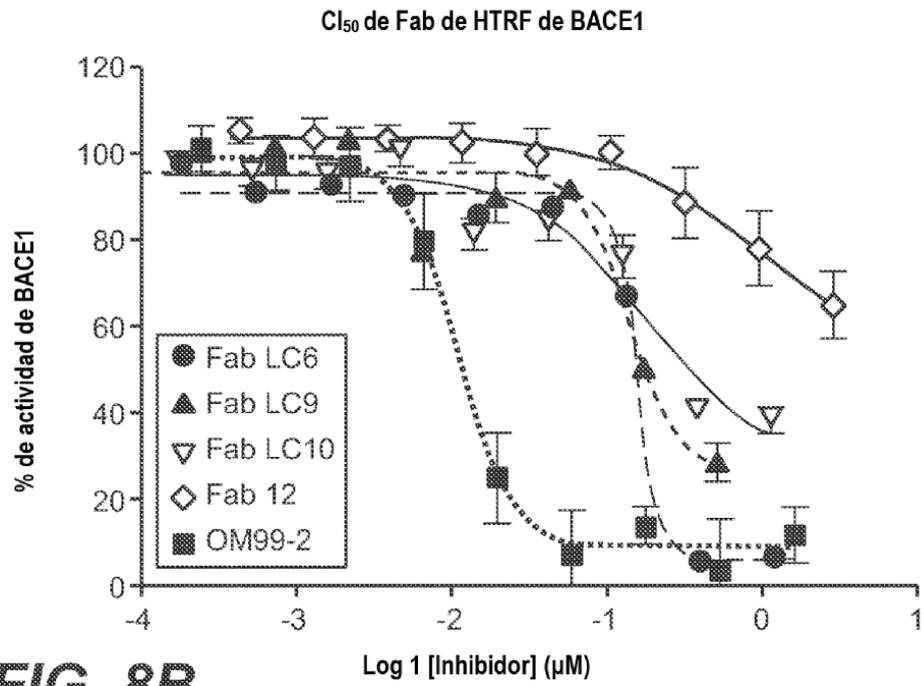


FIG. 8A



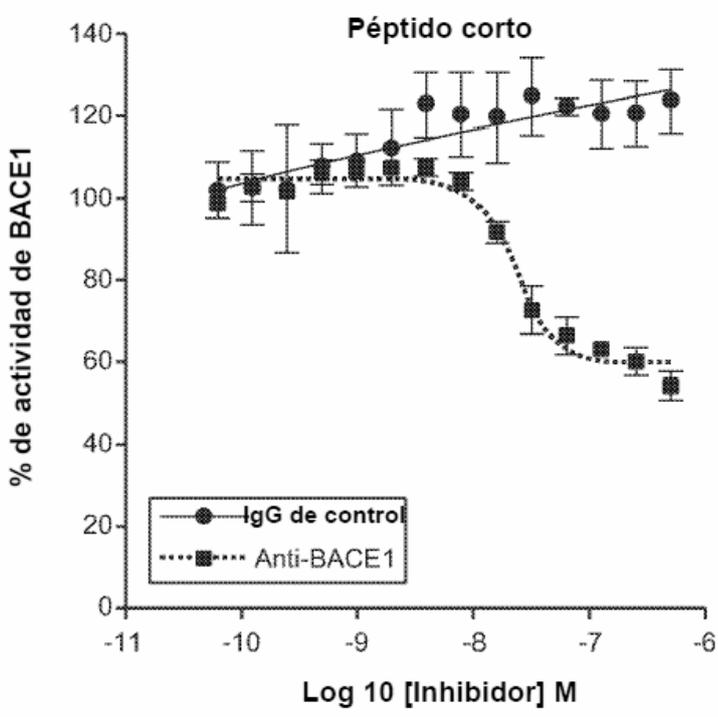
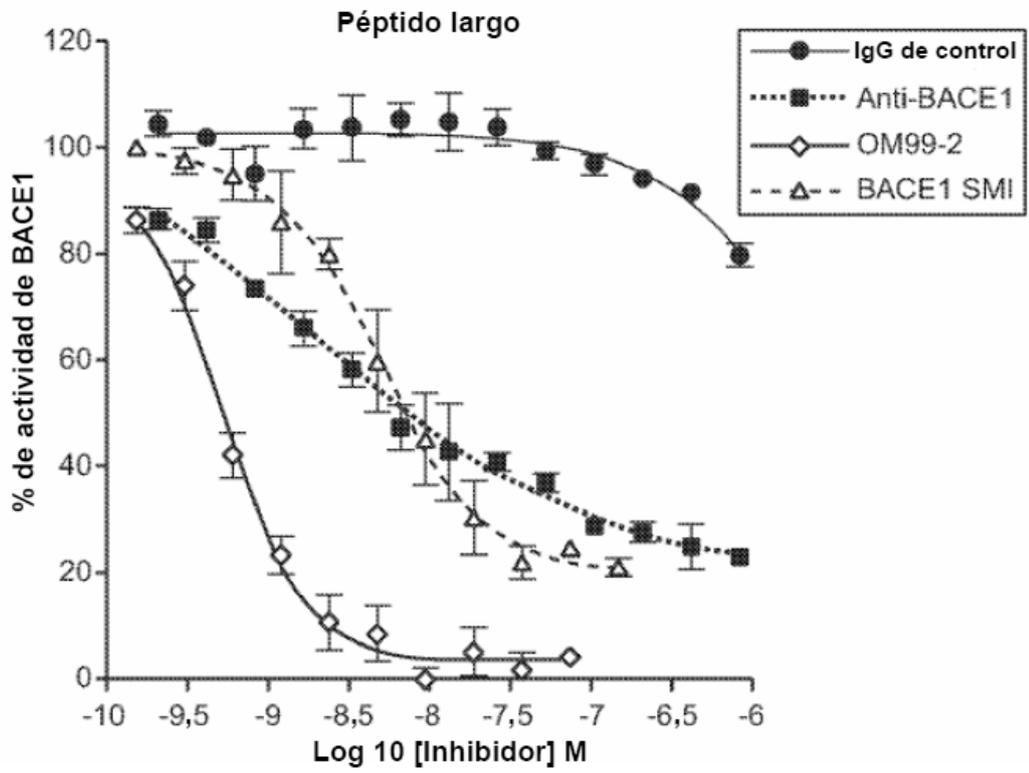


FIG. 9A

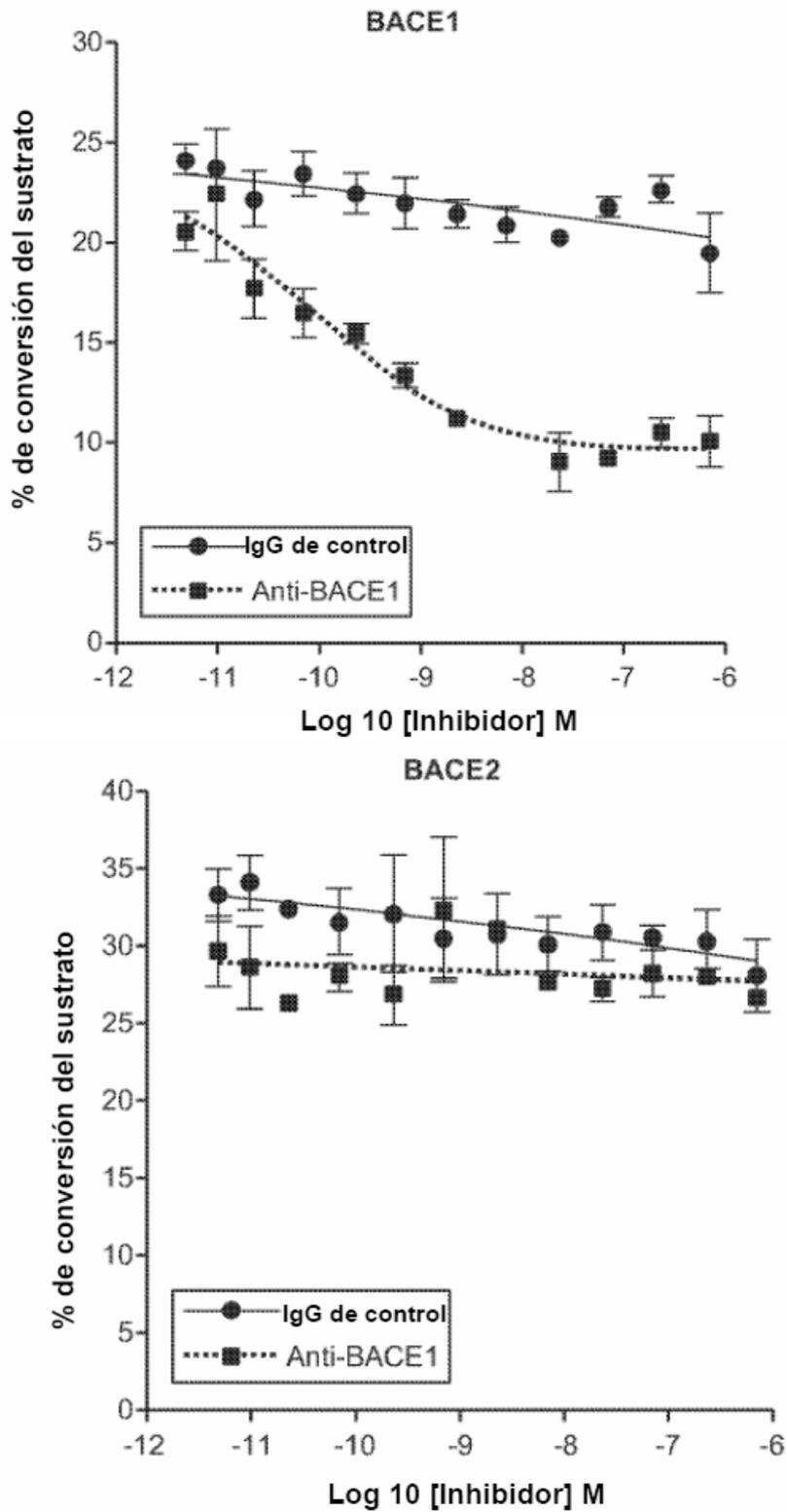
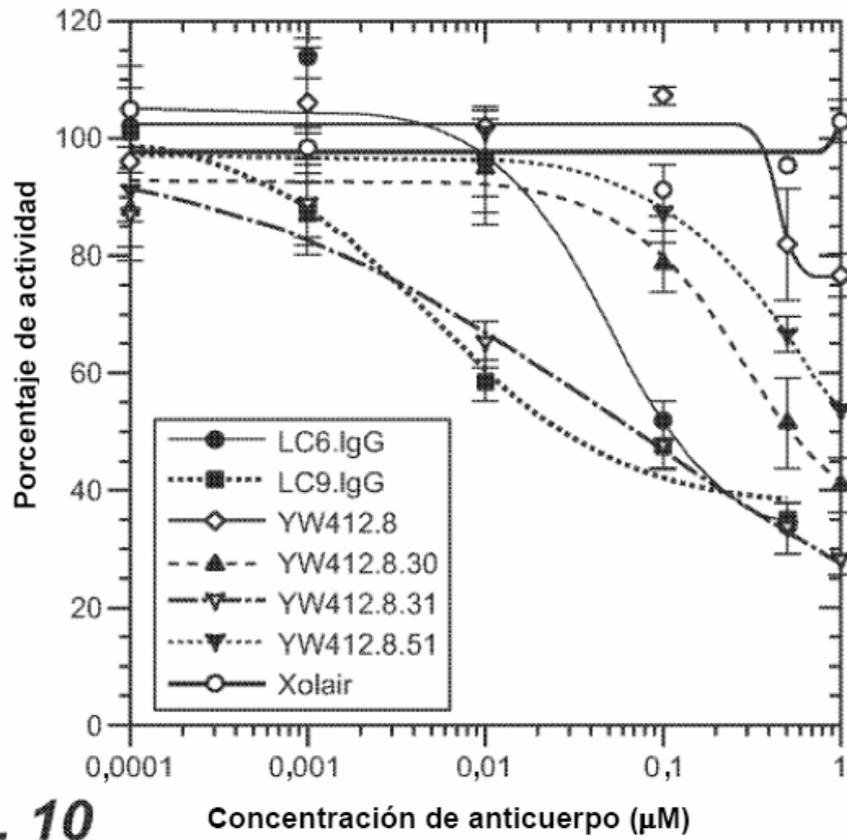
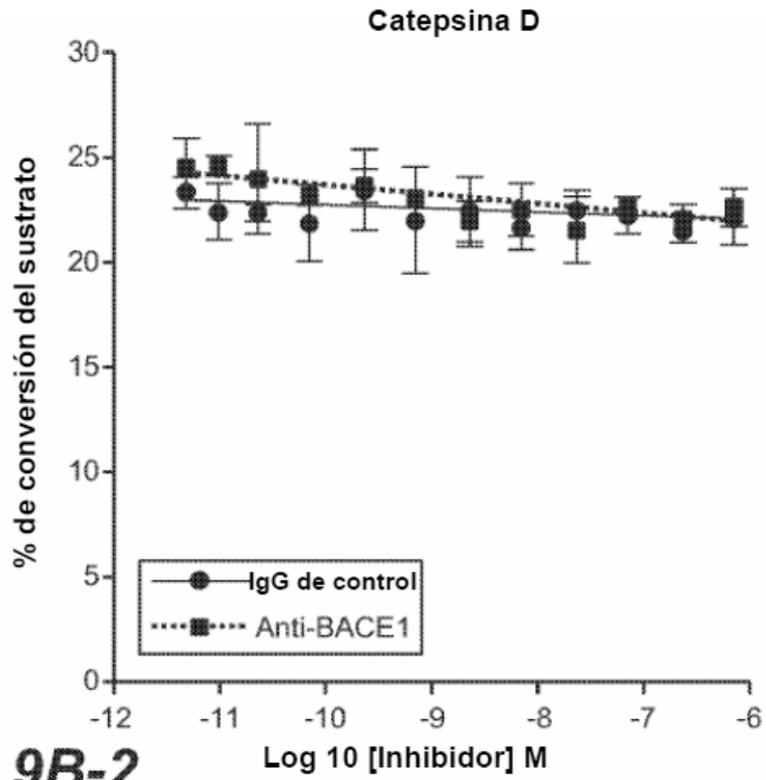
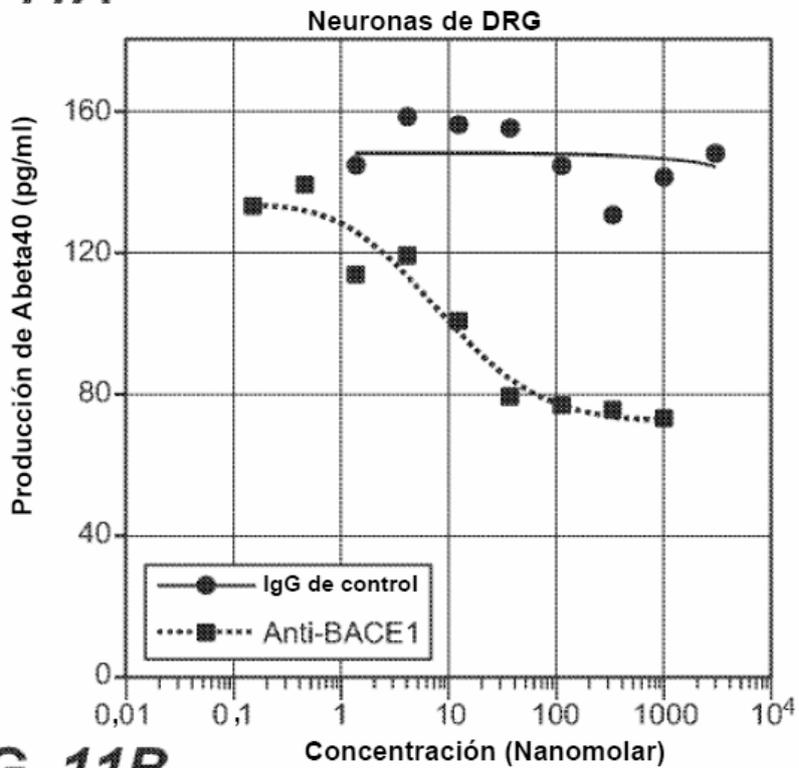
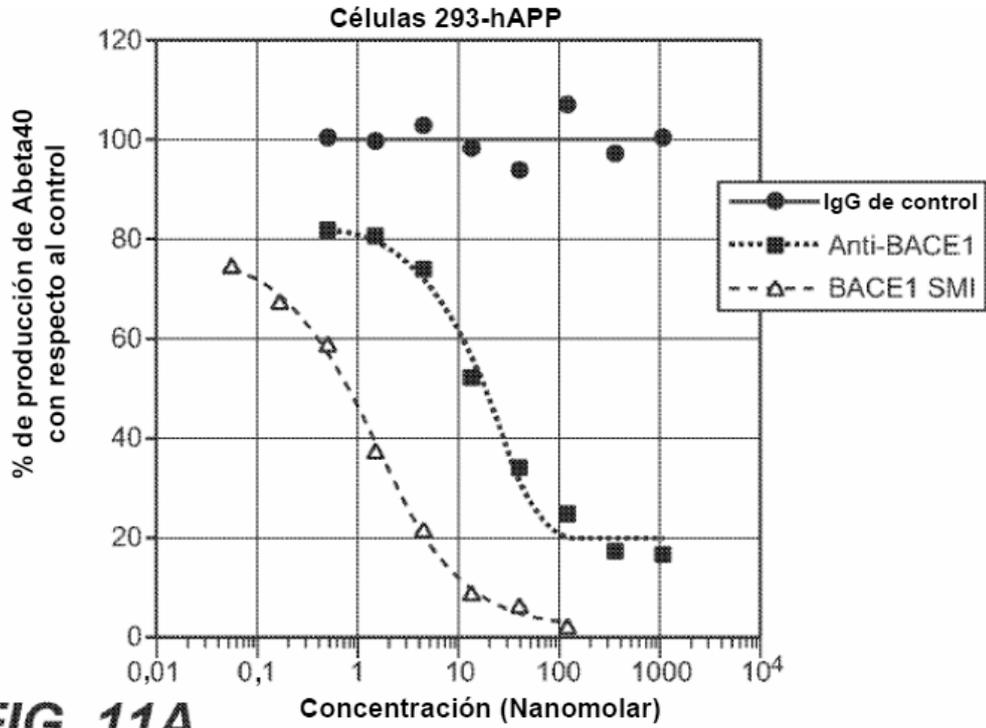
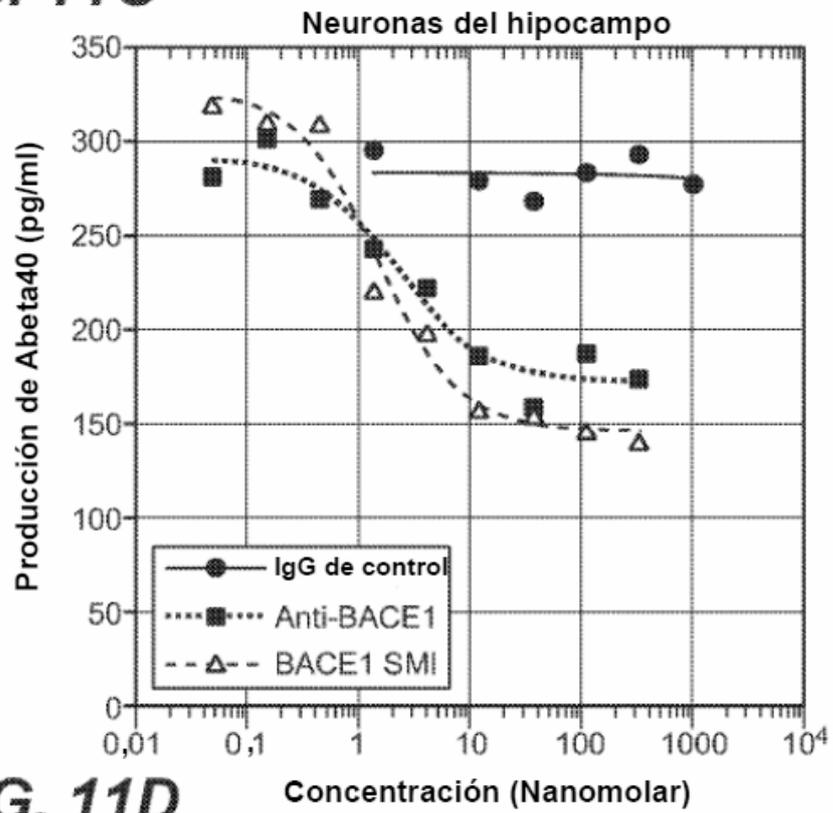
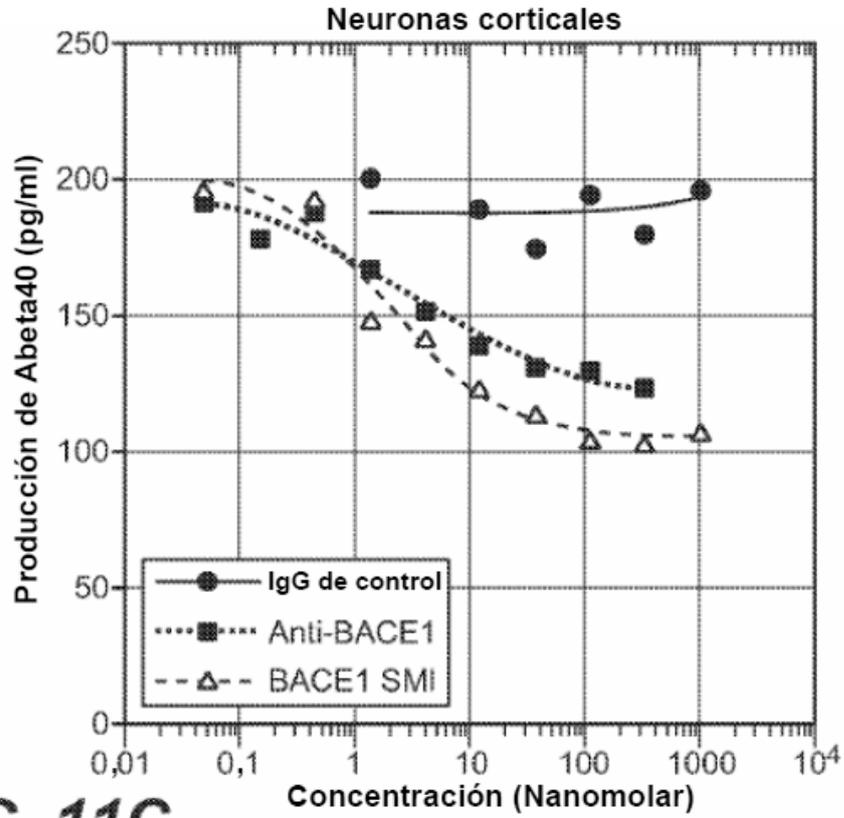


FIG. 9B-1







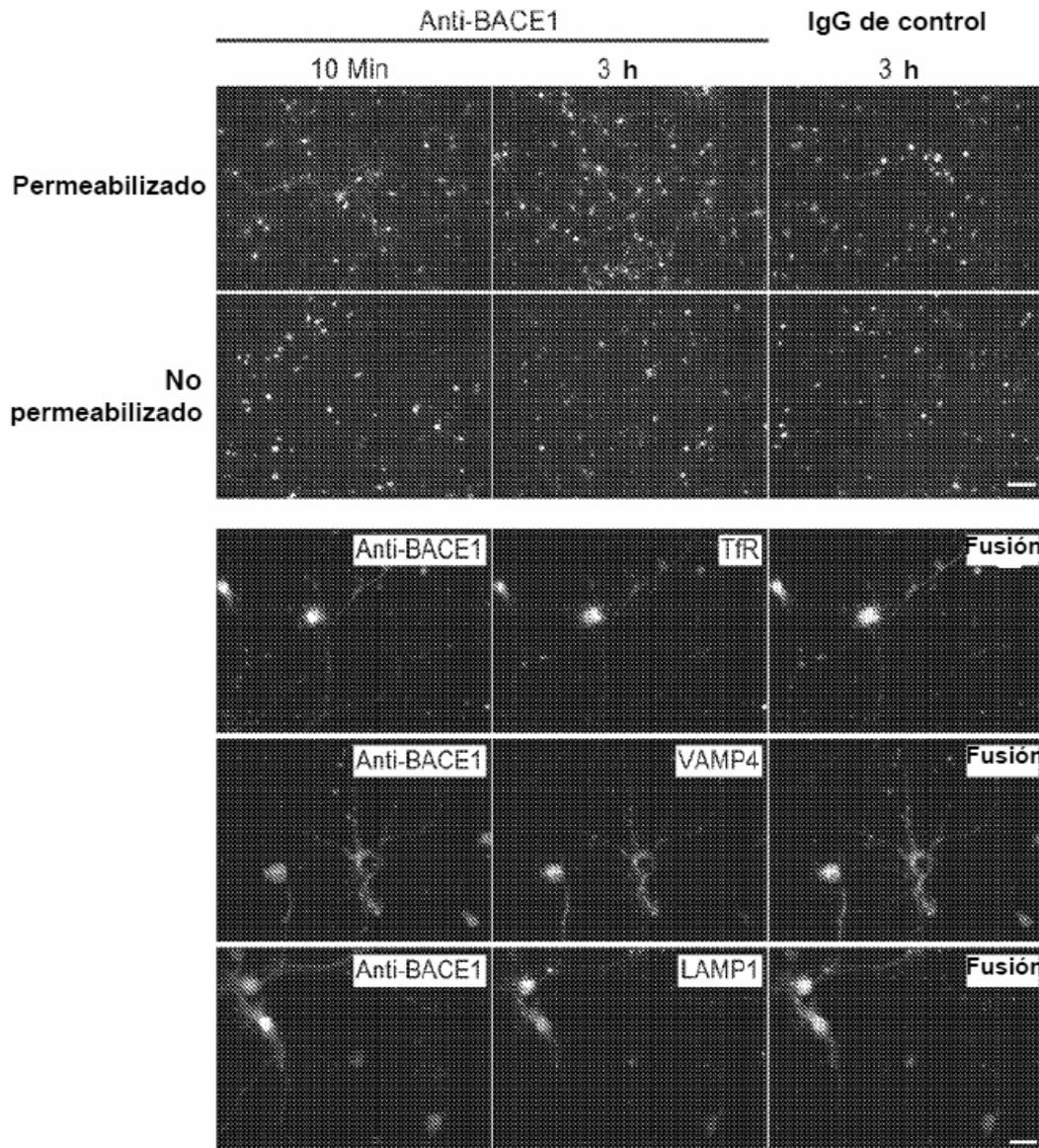


FIG. 12A

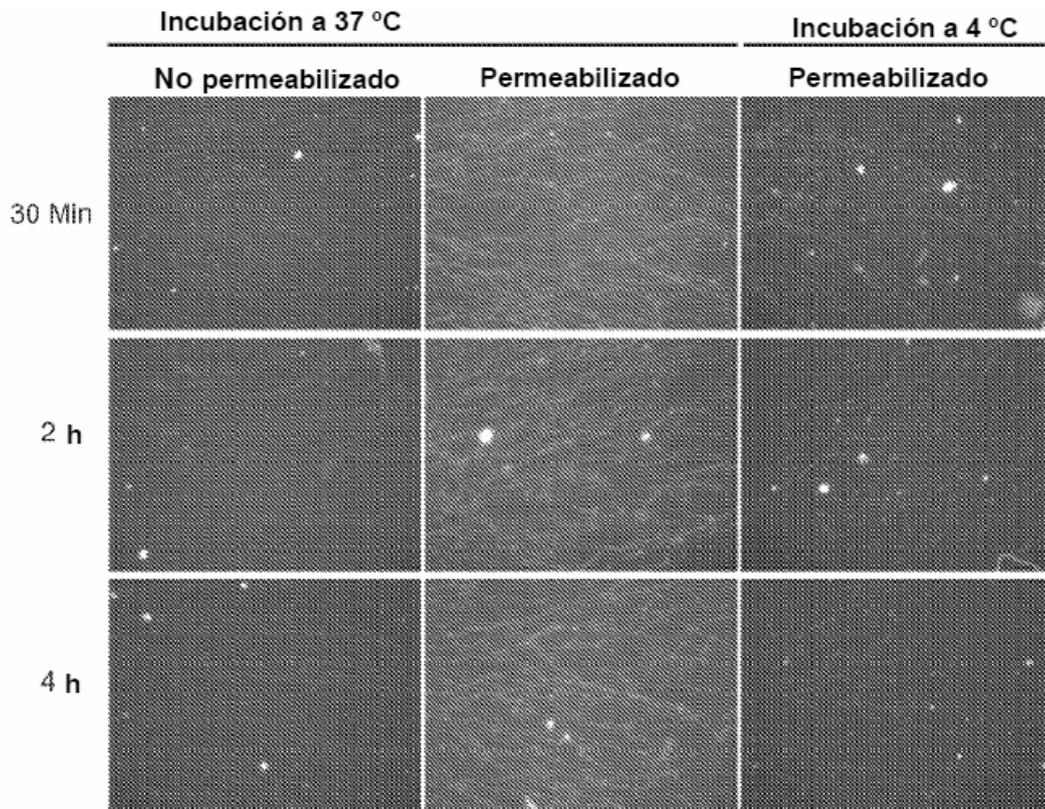


FIG. 12B

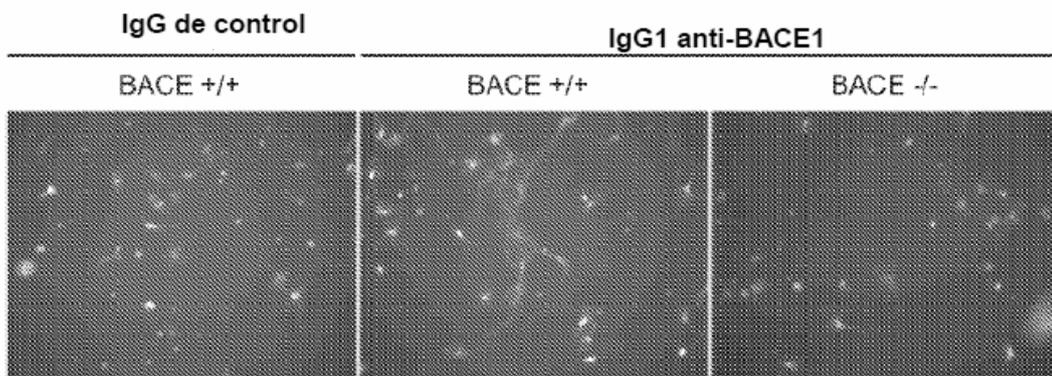


FIG. 12C

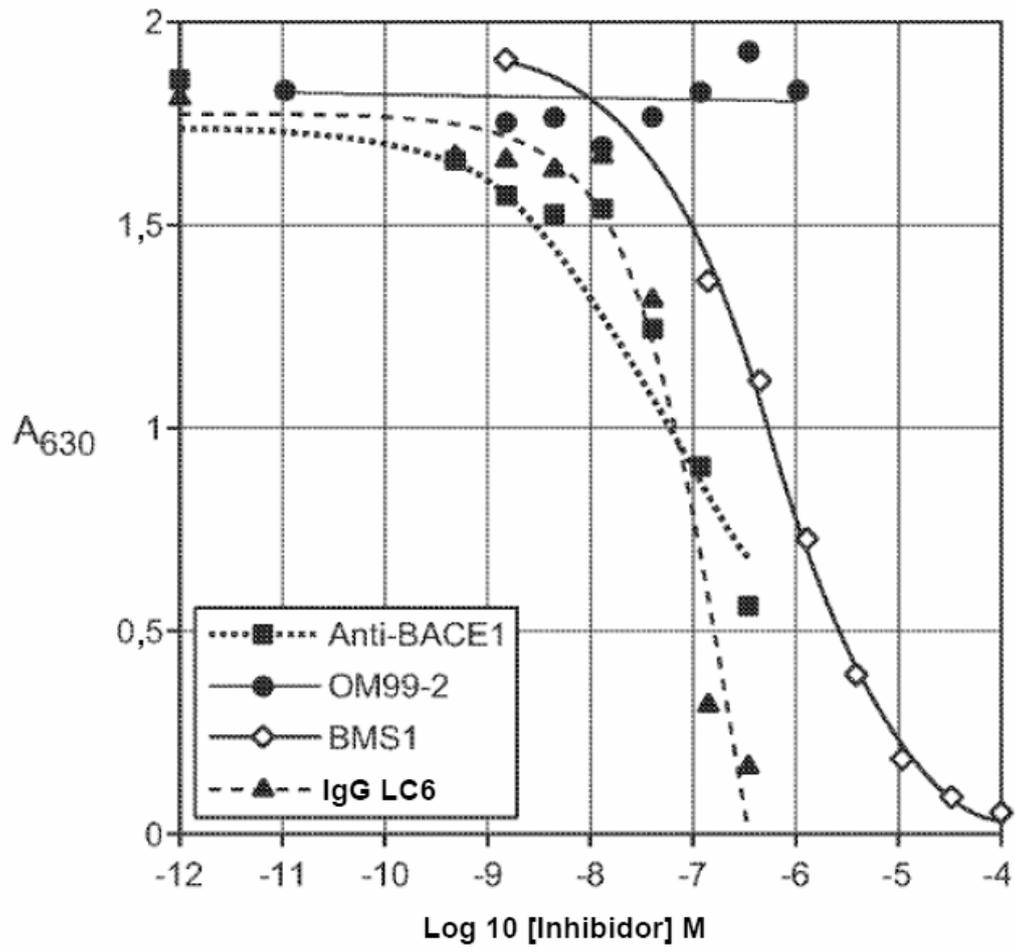


FIG. 13

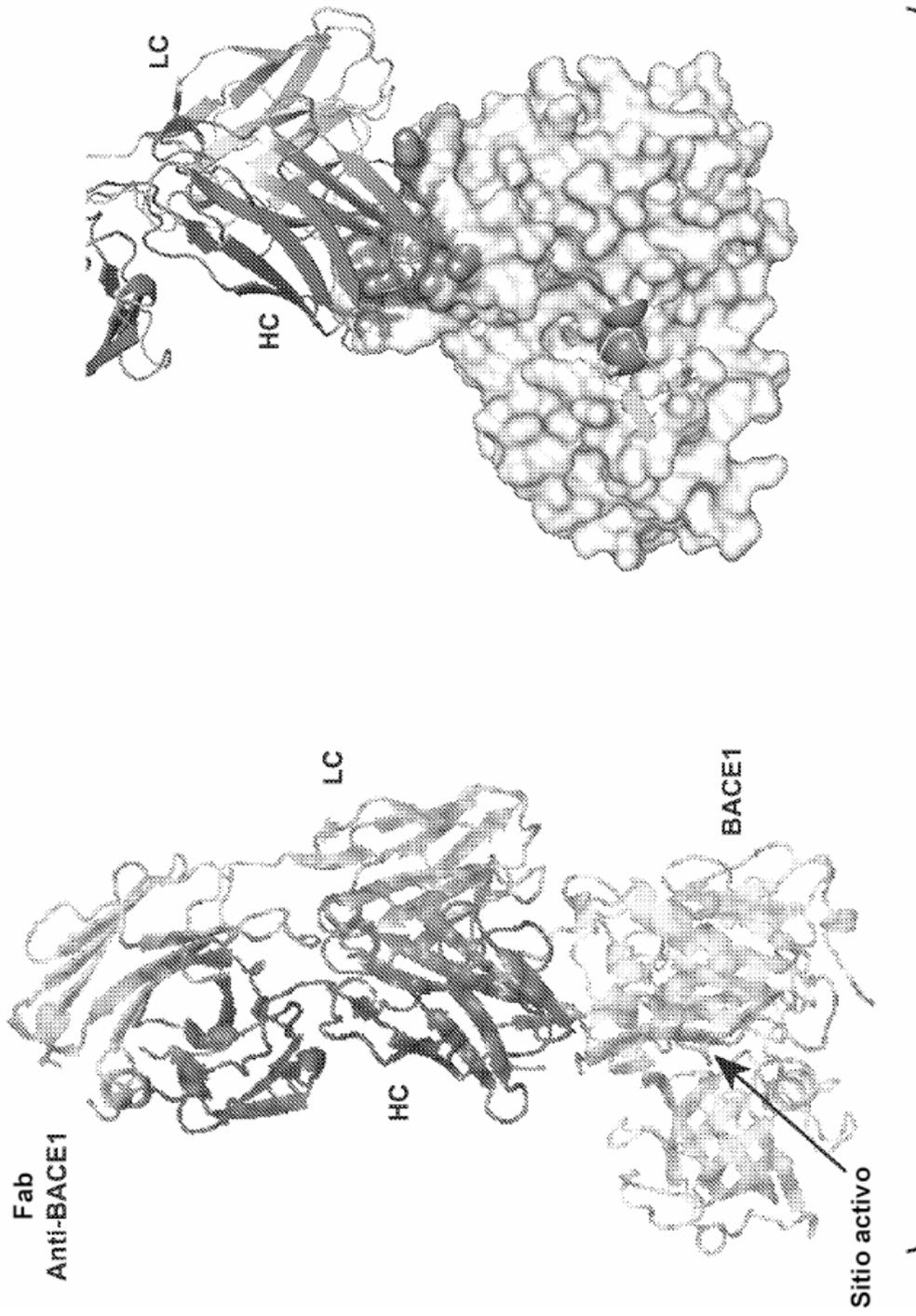


FIG. 14

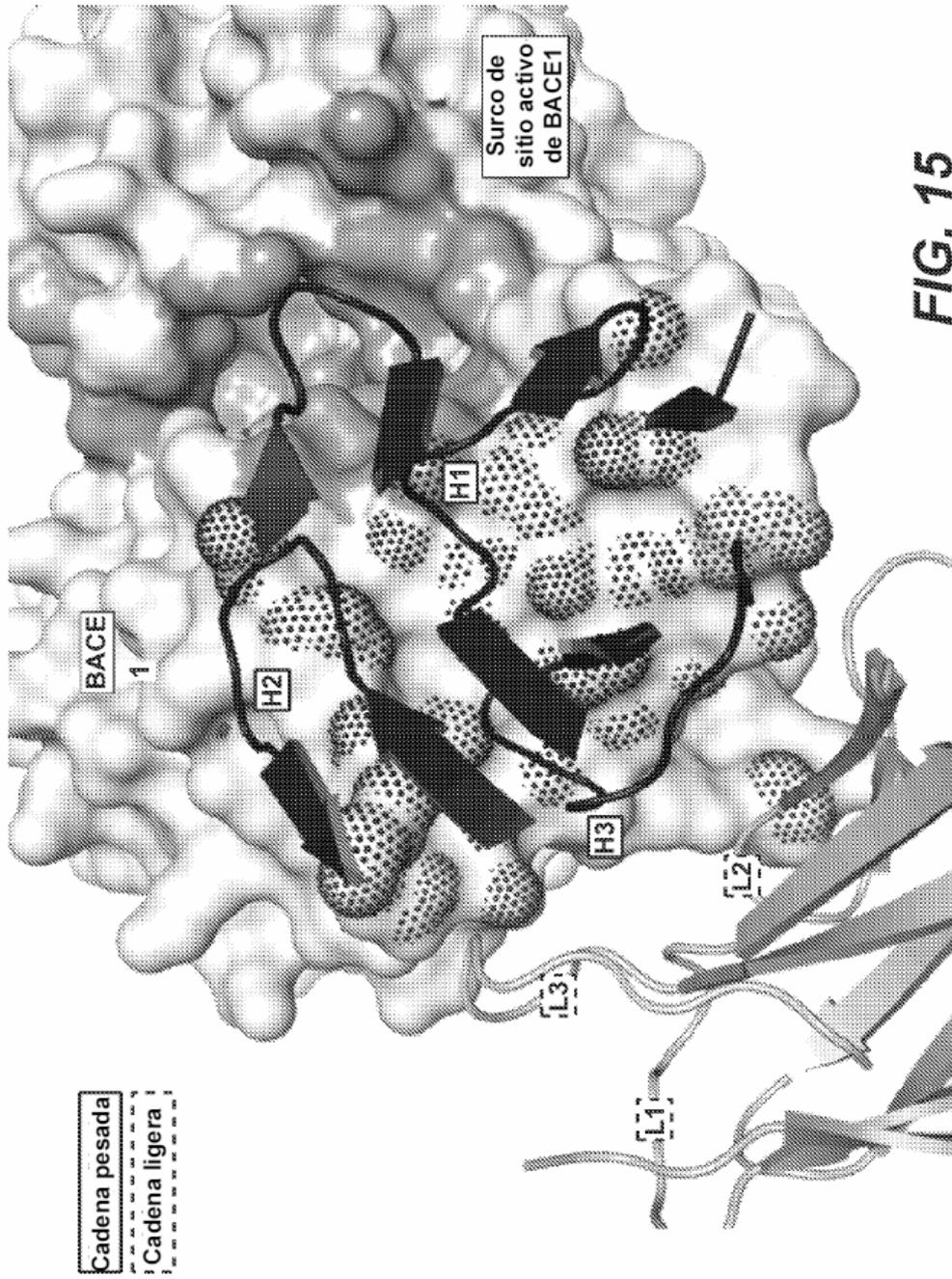


FIG. 15

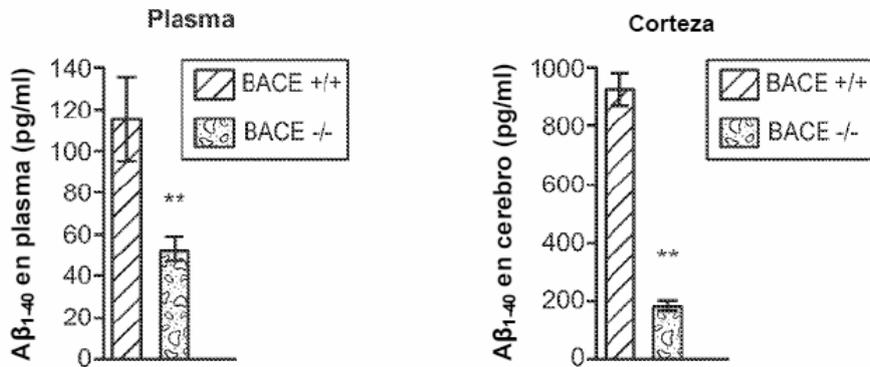


FIG. 16A

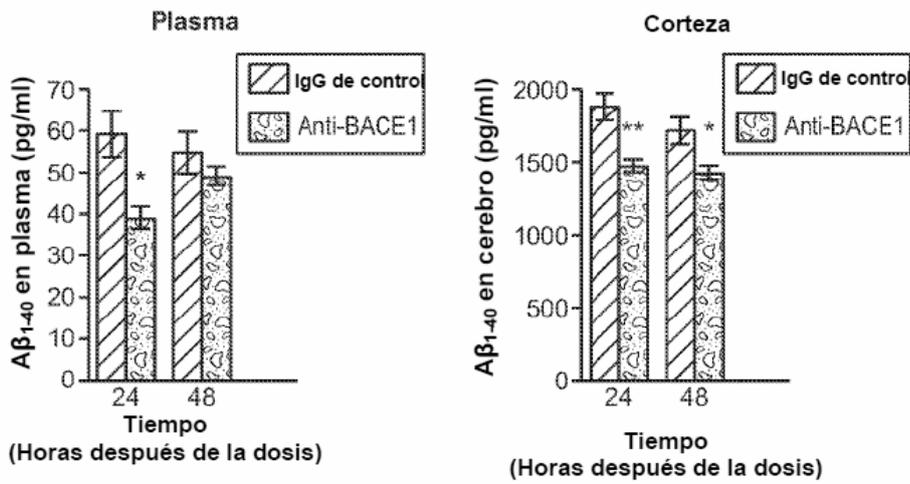


FIG. 16B

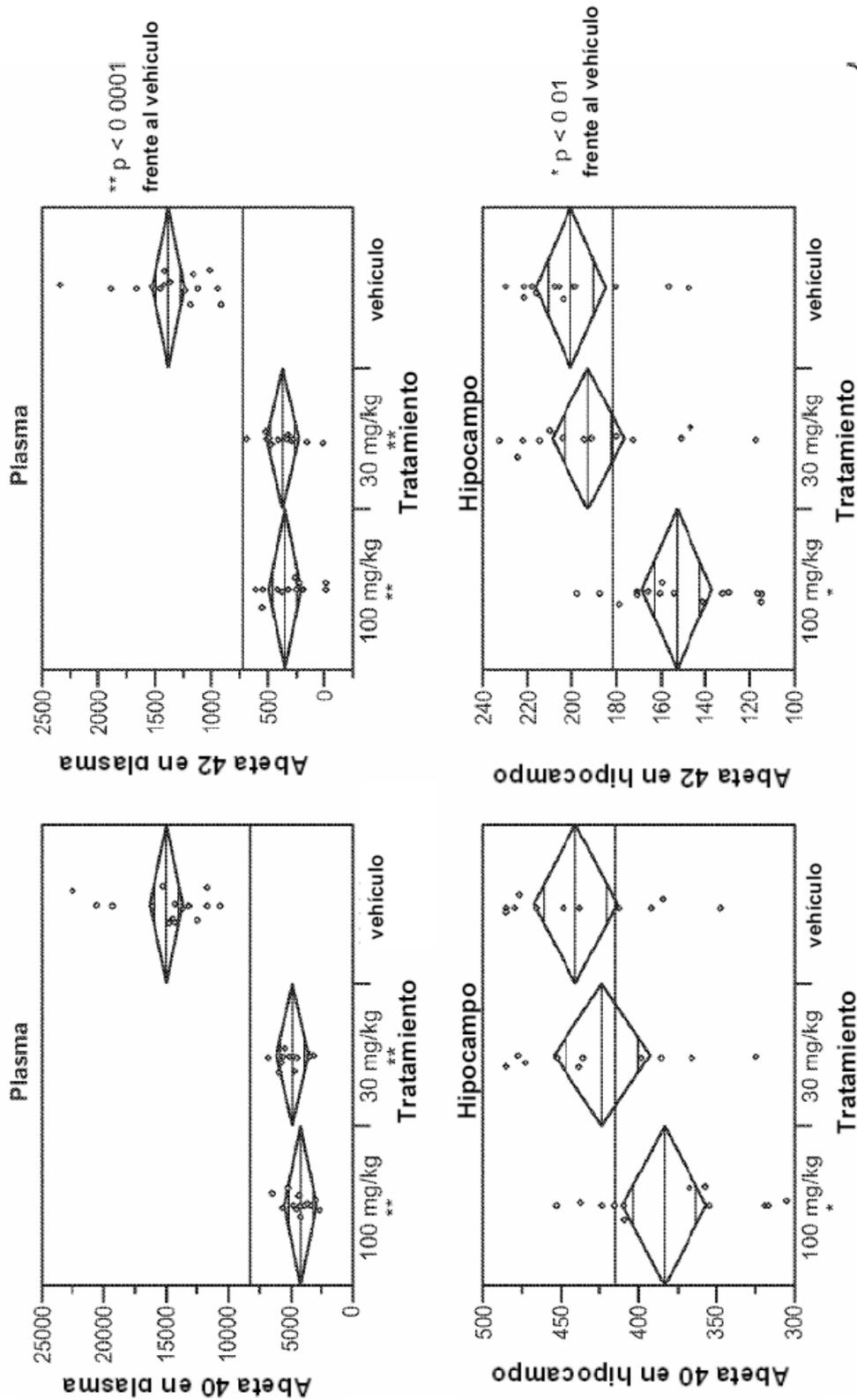


FIG. 17A

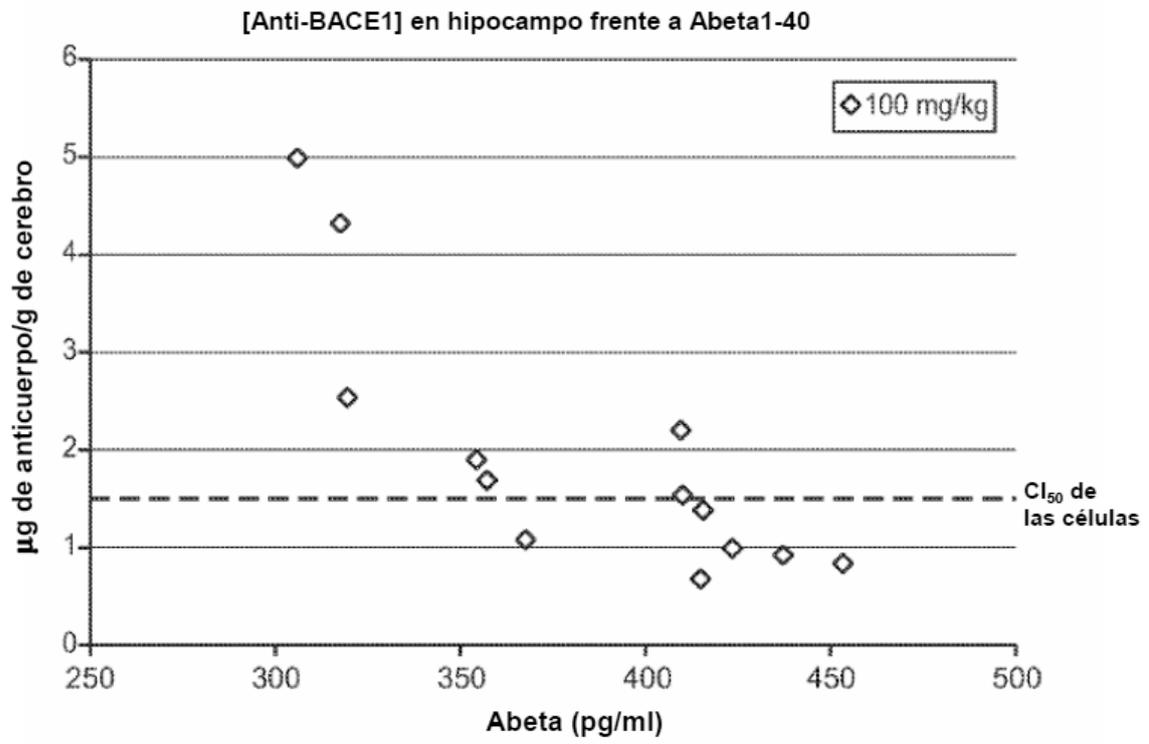


FIG. 17B

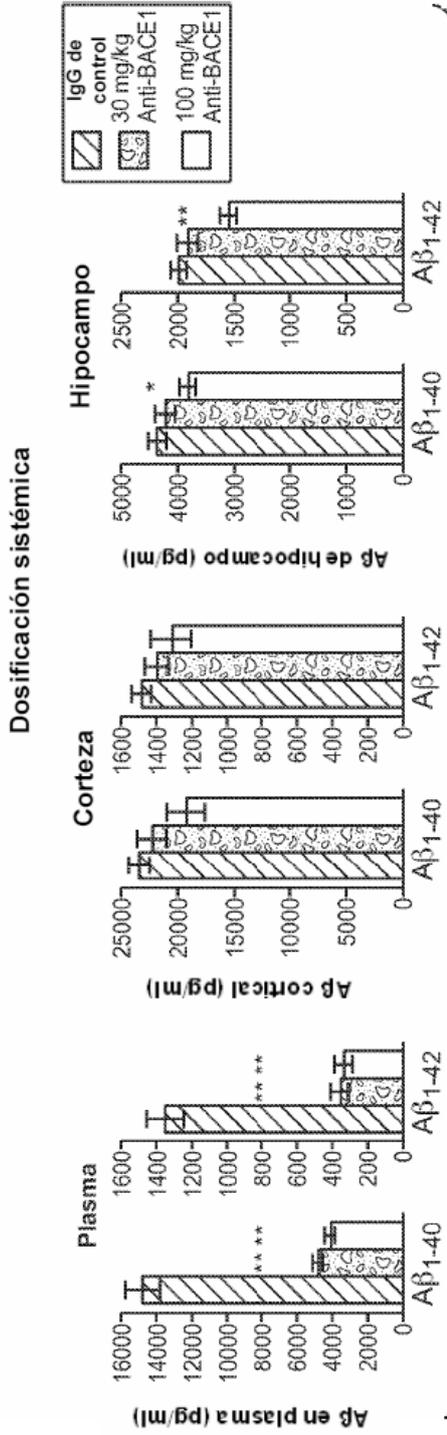


FIG. 18A

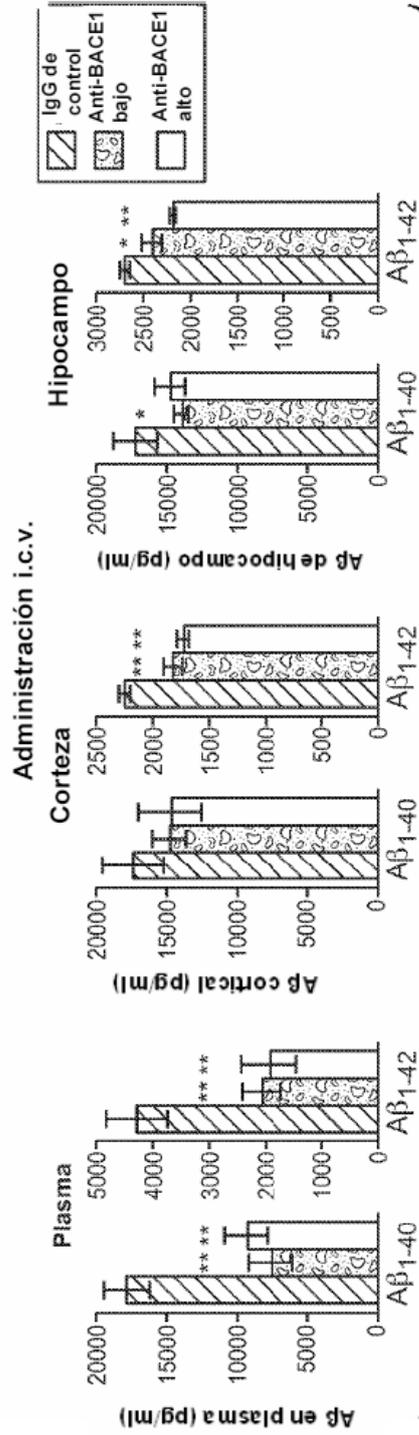


FIG. 18B

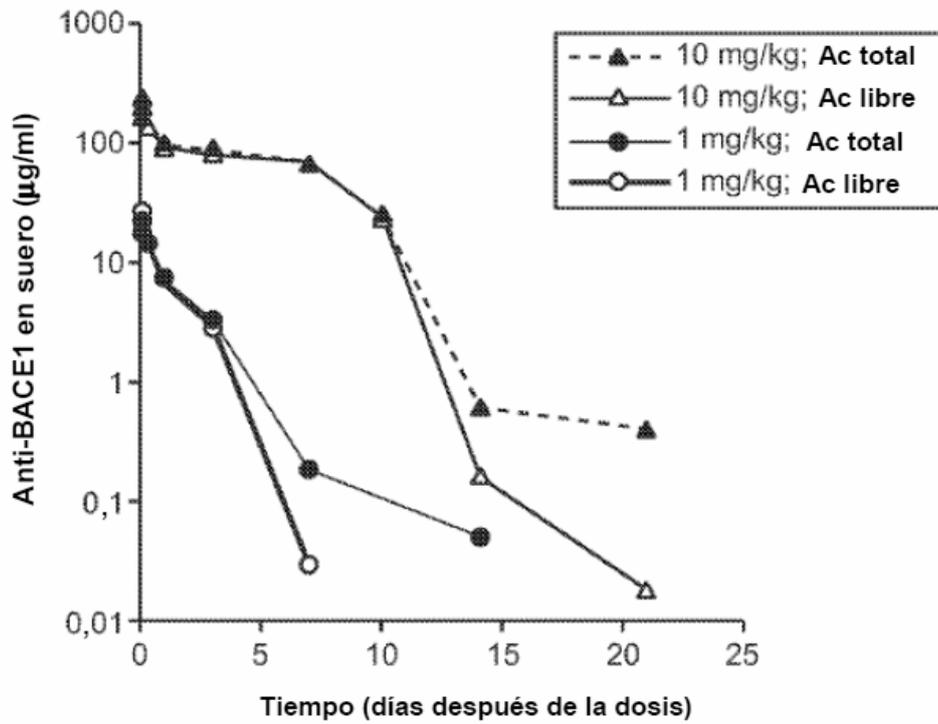


FIG. 19A

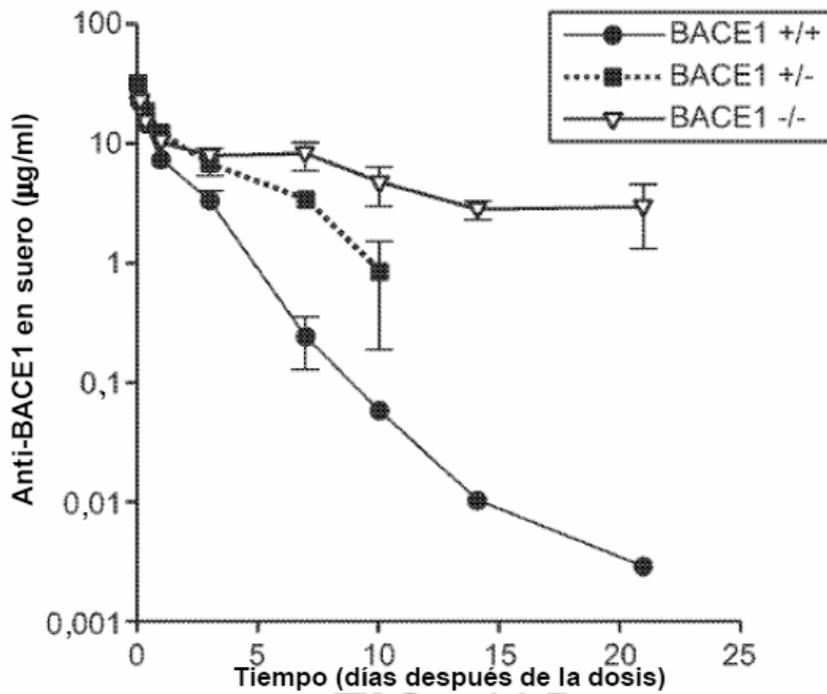


FIG. 19B

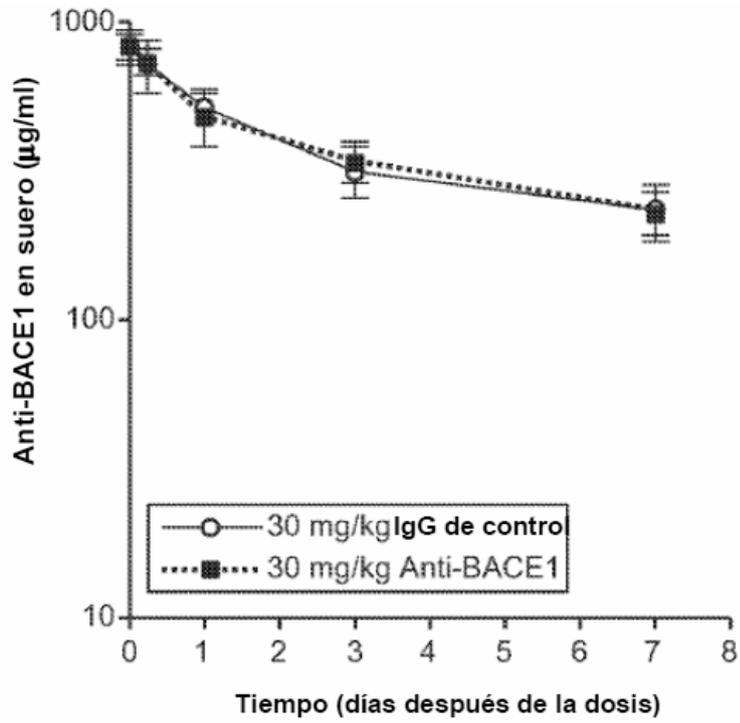


FIG. 20A

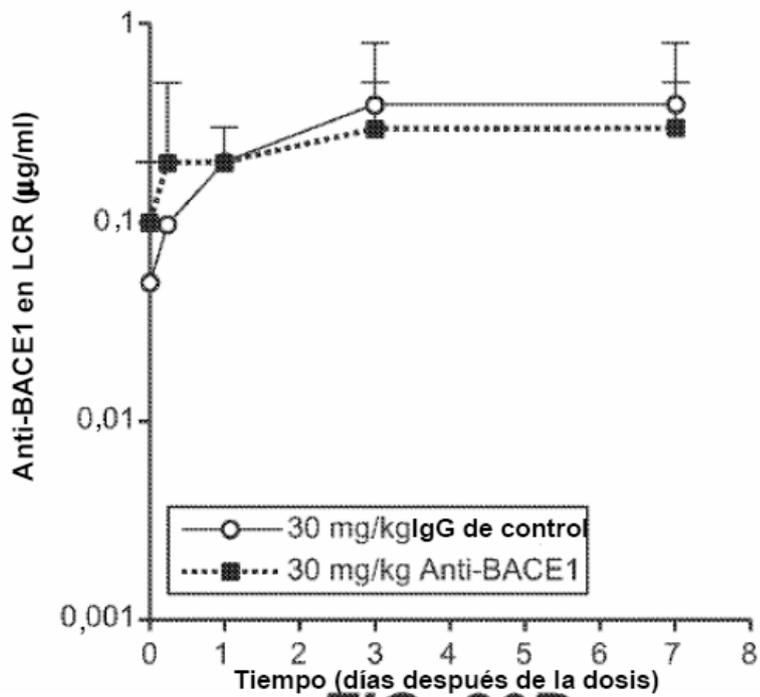
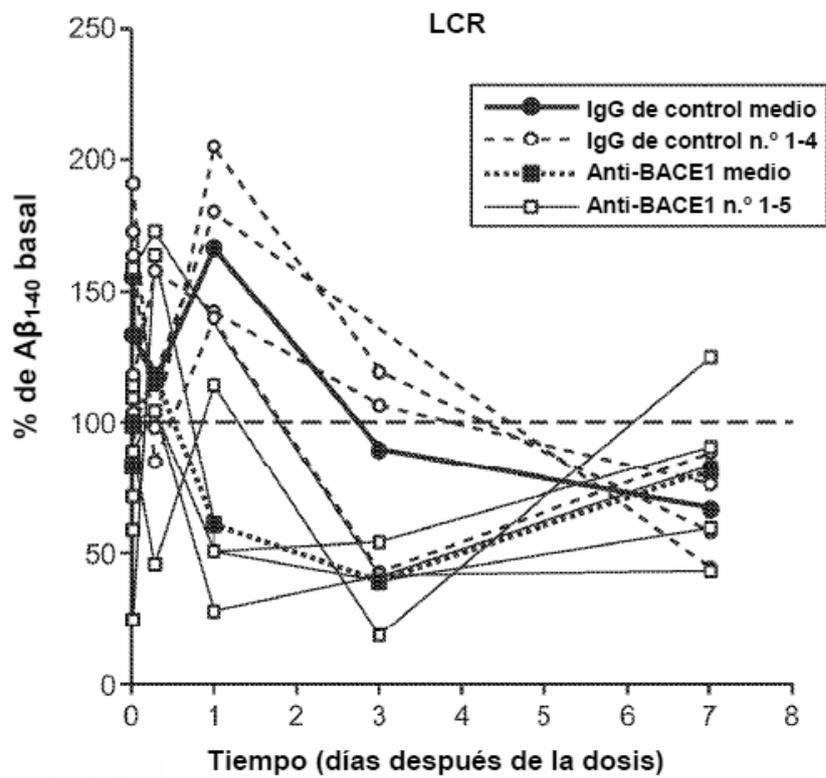
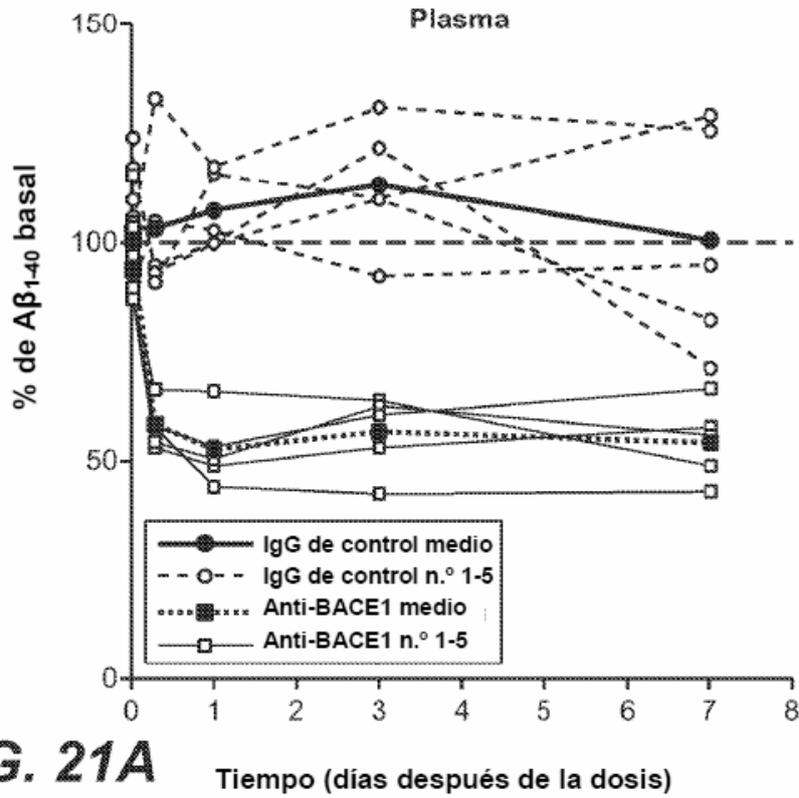


FIG. 20B



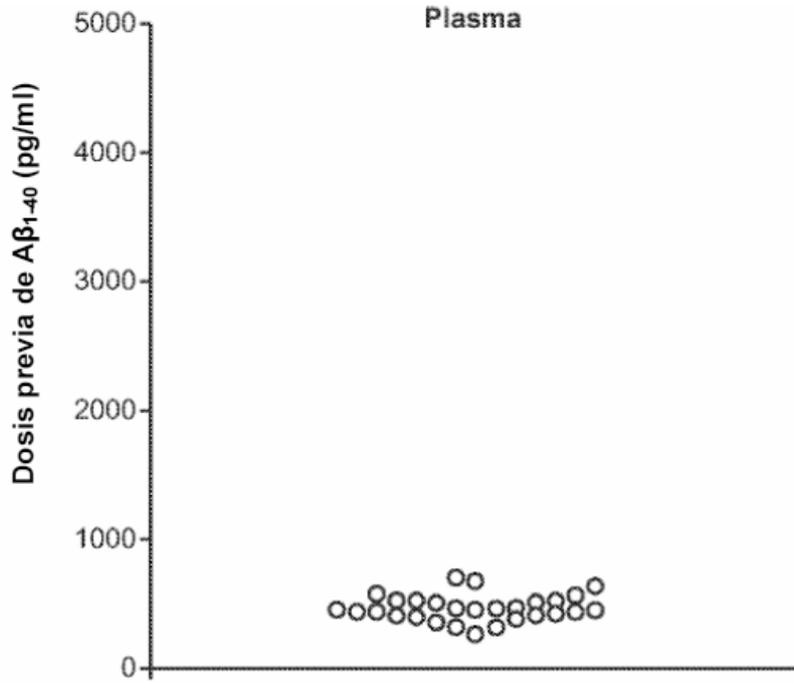


FIG. 21C

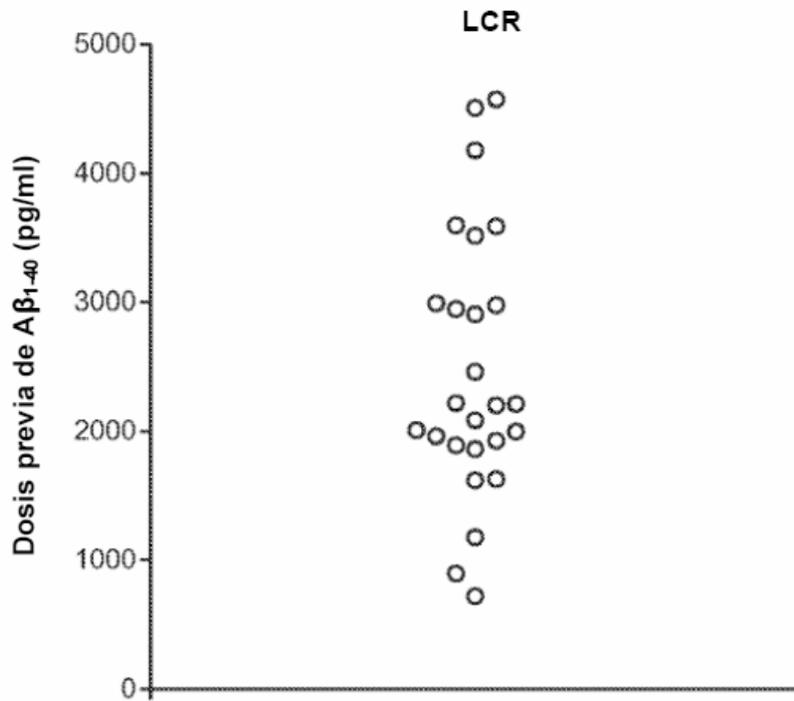


FIG. 21D

Dosis única (100 mg/kg)

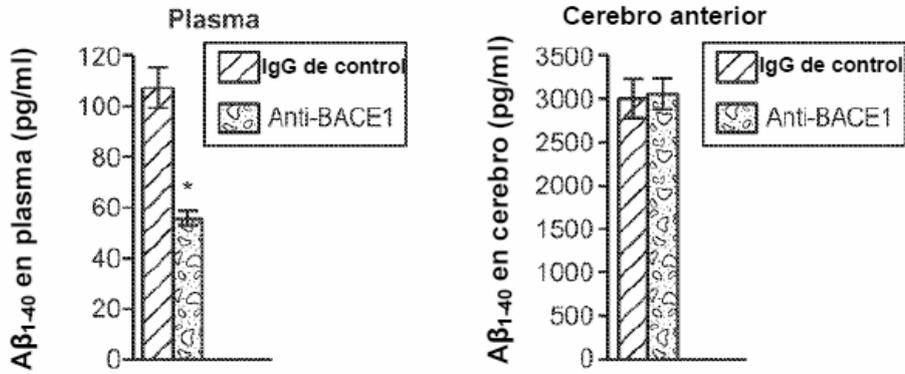


FIG. 22A

Múltiples dosis (30 o 100 mg/kg)

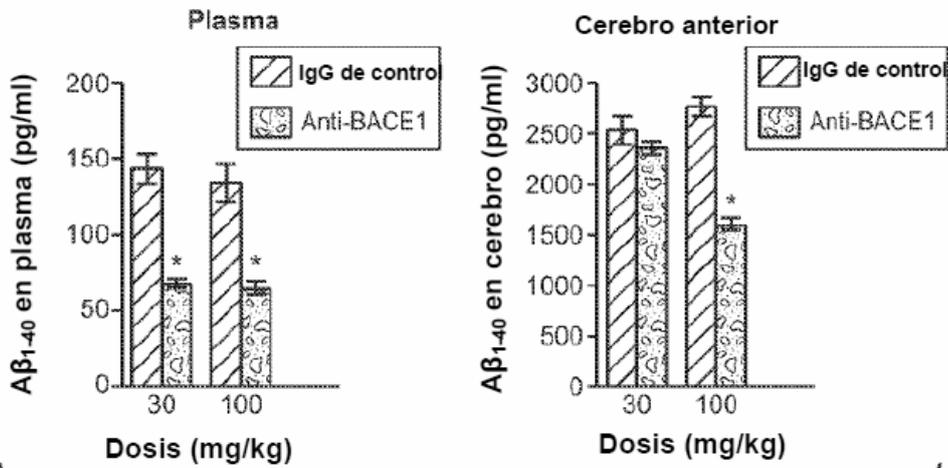


FIG. 22B

n.º de Kabat	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
YW412.8.31	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P
YW412.8.31.41S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.25BS	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.81S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.6S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.75S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.9S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.65S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.86S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.55S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.58S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.25S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.3S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.89S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.54S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.71S	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.51	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.53	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.69	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	
YW412.8.31.77	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	S	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	F	I	S	S	L	Q	P	

FIG. 23B

n.° de Kabat	Kabat - CDR H1																																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
YW412.8.31	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.41S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.258S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.81S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.6S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.75S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.9S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.65S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.86S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.55S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.58S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.25S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.3S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.89S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.54S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.71S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.53	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.69	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.77	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	E	W	V	R	Q	A	

FIG. 24A

n.º de Kabat 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

Kabat - CDR H2	
Chothia - CDR H2	
Contacto - CDR H2	
YW412.8.31	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.41S	G W I S P S G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.25BS	G W I S P Q G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.81S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.6S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.75S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.9S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.65S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.86S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.55S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.58S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.25S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.3S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.89S	G W I S P A G G K T D Y A D S V K G
YW412.8.31.54S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.71S	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.51	G W I S P A G G L Y D Y A D S V K G
YW412.8.31.53	G W I S P S G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.69	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G
YW412.8.31.77	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G

FIG. 24B

n. ° de Kabat	79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113	SEQ ID NO:
	Kabat - CDR H3	
	Chothia - CDR H3	
	Contacto - CDR H3	
YW4128.31	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.41S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.258S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.81S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.6S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.75S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.9S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.65S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.86S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.55S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.56S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.25S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.3S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.89S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.54S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.71S	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.51	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.53	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.69	G P F S P W V	M D Y
YW4128.31.77	G P F S P W V	M D Y

FIG. 24C

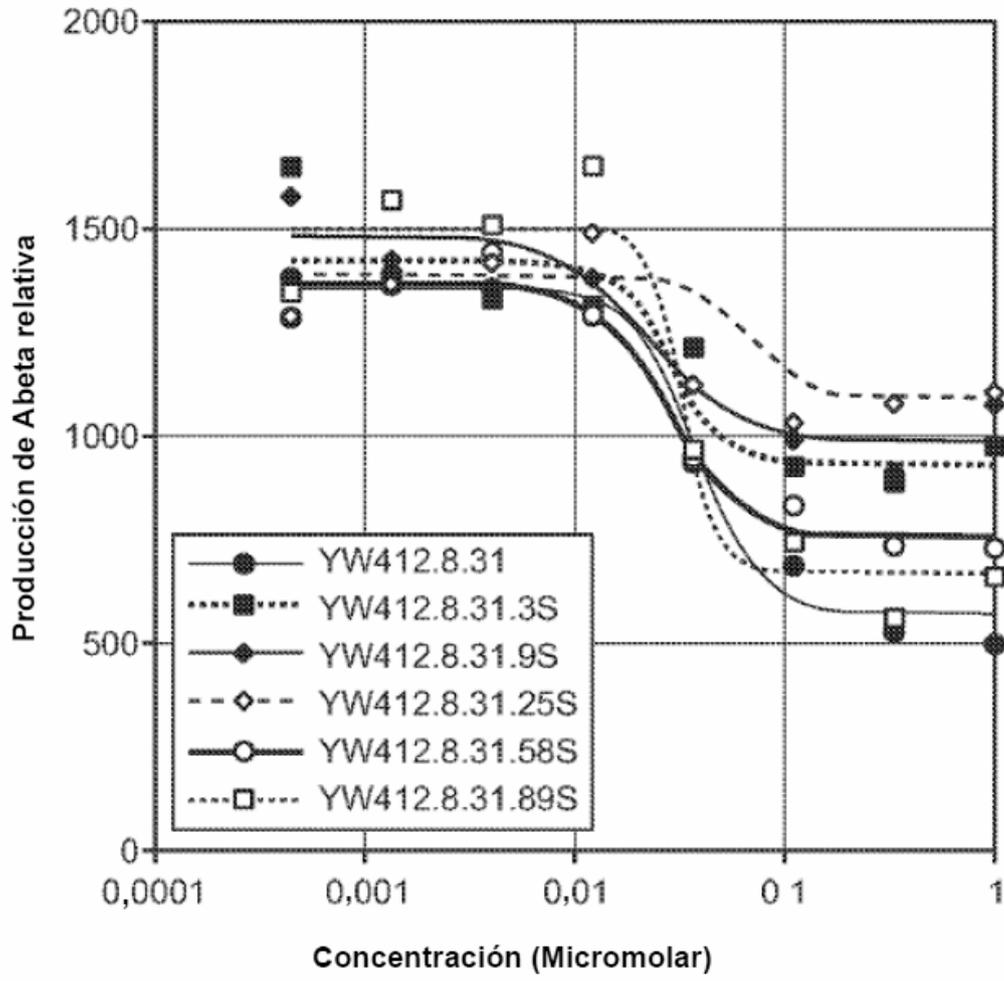


FIG. 25A

Clones YW412.8.31 AM

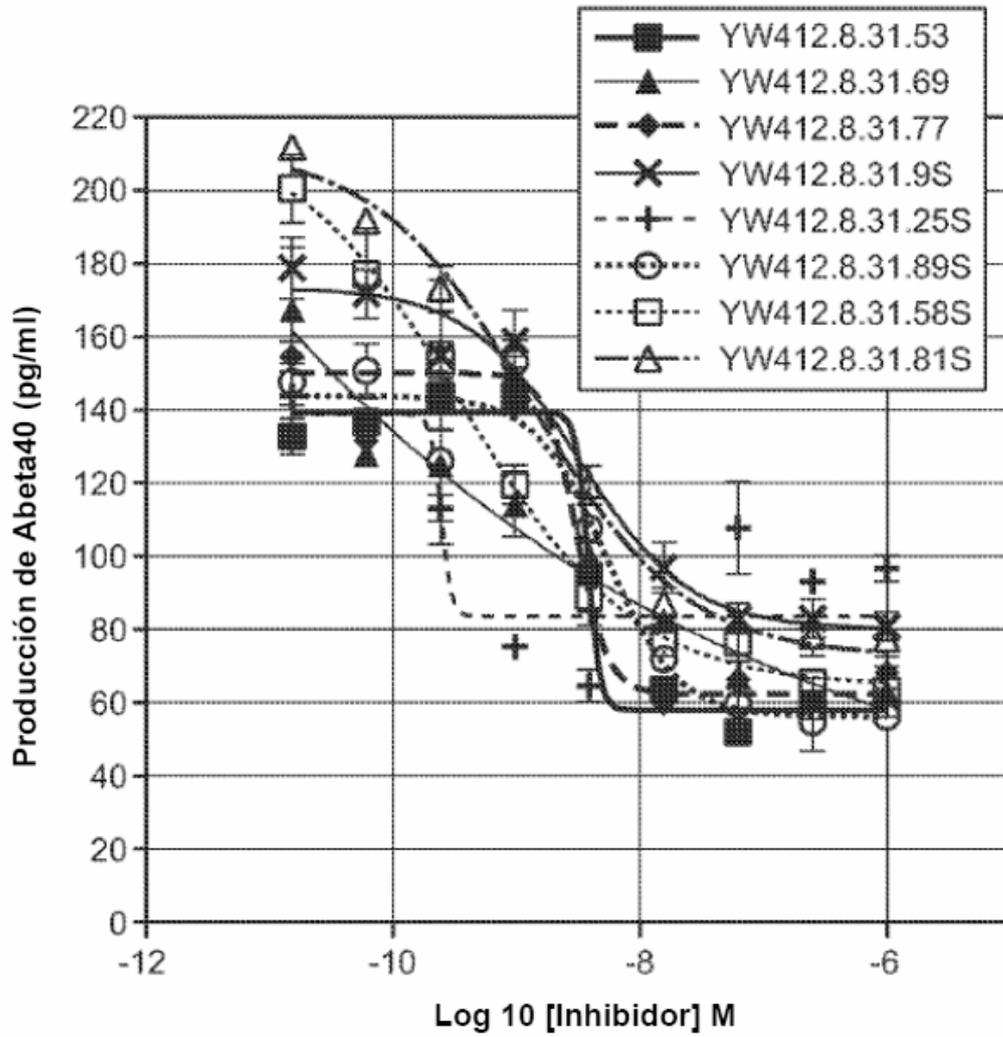


FIG. 25B