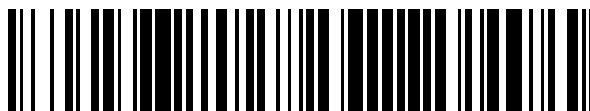


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 427**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2001 E 04011466 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 1481992**

54 Título: **Anticuerpos humanizados que secuestran el péptido beta amiloideo**

30 Prioridad:

24.02.2000 US 184601 P

08.12.2000 US 254465 P

08.12.2000 US 254498 P

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

08.05.2017

73 Titular/es:

WASHINGTON UNIVERSITY ST. LOUIS (50.0%)
1 BROOKINGS DRIVE
ST. LOUIS, MISSOURI 63110, US y
ELI LILLY & COMPANY (50.0%)

72 Inventor/es:

HOLTZMAN, DAVID, M.;
DEMATTOS, RONALD;
BALES, KELLY, R.;
PAUL, STEVEN, M.;
TSURUSHITA, NAOYA y
VASQUEZ, MAXIMILIANO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 611 427 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados que secuestran el péptido beta amiloideo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados que se unen a un epítipo entre los aminoácidos 13 y 28 del péptido A β y para el tratamiento preventivo y terapéutico de las enfermedades relacionadas con el beta amiloideo, tales como la enfermedad de Alzheimer. Más específicamente, se refiere al uso de anticuerpos monoclonales humanizados para secuestrar el péptido beta amiloideo (A β) en el plasma, cerebro y fluido cerebroespinal para impedir la acumulación o para invertir la deposición del péptido A β en el cerebro y en los vasos sanguíneos del cerebro y para mejorar la cognición.

Antecedentes de la técnica

10 Numerosas patologías que dan como resultado insuficiencias cognitivas, apoplejía, hemorragia cerebral y debilitamiento mental general parecen estar relacionadas a las placas neuríticas y cerebrovasculares en el cerebro que contienen el péptido beta amiloideo (A β). Entre estas afecciones están la enfermedad de Alzheimer tanto preclínica como la clínica, el síndrome de Down y la angiopatía amiloidea cerebral preclínica y clínica (AAC). Las
15 placas amiloideas están formadas por péptidos beta amiloideos. Estos péptidos circulan en la sangre y en el fluido cerebroespinal (FCE), normalmente en forma acoplada con lipoproteínas. El péptido A β en forma circulante se compone de 39-43 aminoácidos (principalmente 40 o 42 aminoácidos) que resultan de la escisión de una proteína precursora común, una proteína precursora amiloidea, con frecuencia denominada APP. Algunas formas de A β soluble son en sí mismas neurotóxicas y pueden determinar la gravedad de la neurodegeneración y/o la disminución
20 cognitiva (McLean, C.A., y col., Ann. Neurol. (1999) 46:860-866; Lambert, M.P., y col., (1998) 95:6448-6453; Naslund, J., J. Am. Med. Assoc. (2000) 283:1571).

25 La evidencia sugiere que el A β puede transportarse de ida y vuelta entre el cerebro y la sangre (Gherzi- Egea, J-F., y col., J. Neurochem. (1996) 67:880-883; Zlokovic, B.V., y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67:1034-1040; Shibata M, y col., J. Clin. Invest. (2000) 106 :1489-1499). Además el A β en las placas está en equilibrio con el A β soluble en el cerebro y en la sangre (Kawarabayashi T, y col., J. Neurosci. (2001) 21:372-381).

30 Como se describe en la solicitud de PCT US00/35681 y en el documento de EE.UU. con n.º de serie 09/153.130 los niveles circulantes totales del péptido A β en el FCE son similares en individuos normales y en individuos predispuestos a exhibir los síntomas de Alzheimer. Sin embargo, las concentraciones de A β ₄₂ son menores por término medio en individuos con enfermedad de Alzheimer (Nitsch, R.M., y col., Ann. Neurol. (1995) 37:512-518). Se sabe que el A β ₄₂ es más propenso a acumularse que el A β ₄₀ y cuando esto sucede, surgen consecuencias adversas tales como la deposición del A β en las placas amiloideas, la conversión del A β en formas tóxicas solubles, el daño de las células nerviosas y el deterioro del comportamiento tal como la demencia (Golde, T.E., y col., Biochem. Biophys. Acta. (2000) 1502:172-187).

35 Los procedimientos para inducir una respuesta inmune para reducir los depósitos amiloideos se describen en la publicación PCT WO99/27944 publicada el 10 de junio de 1999. La descripción postula que el péptido A β agregado de longitud completa sería un inmunógeno útil. La administración de un fragmento A β (aminoácidos 13-28) conjugado a una IgG anti-ratón de oveja no produjo cambios en la carga amiloidea de la corteza cerebral y únicamente uno entre nueve animales que recibieron inyecciones del conjugado del fragmento 13-28 del A β mostró alguna linfoproliferación en respuesta al A β ₄₀. La solicitud también indica que podrían usarse los anticuerpos que se unen específicamente al péptido A β como agentes terapéuticos. Sin embargo, esto parece ser una especulación ya que los datos que lo apoyan reflejan protocolos que implican el uso de inmunización activa, por ejemplo, A β ₄₂. Los péptidos se suministran utilizando adyuvantes y se determinan los títulos de anticuerpo formados en la inmunización, así como los niveles del péptido A β y del péptido precursor. La publicación sugiere claramente que la placa A β debe reducirse para aliviar los síntomas de Alzheimer y que se necesitan los procesos mediados por las células para la
45 reducción exitosa de la placa A β .

50 El documento WO 99/60024, publicado el 25 de noviembre de 1999, se dirige a procedimientos para la retirada de amiloides usando anticuerpos anti-amiloideos. El mecanismo, sin embargo, se indica para utilizar la capacidad de los anticuerpos anti-A β para unirse a los depósitos amiloideos preformados (es decir, placas) y dar como resultado la eliminación microglial local posterior de placas localizadas. Este mecanismo no se ensayó *in vivo*. Esta publicación indica además que para ser eficaz entre las placas A β , los anticuerpos anti-A β deben conseguir entrar en el parénquima cerebral y a través de la barrera hemato-cerebral.

55 Varias solicitudes PCT que se refieren a intentos para controlar las placas amiloideas se publicaron el 7 de diciembre de 2000. El documento WO 00/72880 describe la reducción significativa en las placas en la corteza cerebral y el hipocampo en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer cuando se trata usando fragmentos N-terminales de péptidos A β y anticuerpos que se unen a ellos, pero no cuando se trata con el fragmento 13-28 de A β conjugado con IgG anti-ratón de oveja o con un anticuerpo contra el fragmento 13-28, del anticuerpo 266. Los anticuerpos dirigidos N-terminales se impusieron para cruzar la barrera hemato-cerebral y para inducir la fagocitosis de las placas amiloideas en estudios *in vitro*.

El documento WO 00/72876 tiene prácticamente la misma descripción que el documento WO 00/72880 y se dirige a la inmunización con los propios componentes de la fibrilla amiloidea.

El documento WO 00/77178 describe anticuerpos que se diseñaron para catalizar la hidrólisis del β -amiloide, incluyendo los anticuerpos obtenidos contra una mezcla de los compuestos de transición de fenilalanina estatina Cys-A β ₁₀₋₂₅, estatina Phe₁₉-Phe₂₀ y Cys-A β ₁₀₋₂₅ estatina Phe₂₀-Ala₂₁ y anticuerpos obtenidos contra A β ₁₀₋₂₅ que tienen un enlace amida reducido entre Phe₁₉ y Phe₂₀. Este documento menciona el secuestro de A β , pero esto es una suposición porque no da evidencia de tal secuestro. Además, el documento no proporciona evidencia *in vivo* de que la administración de anticuerpos produzca la salida de A β del sistema nervioso central, interfiera con la formación de placas, reduzca la carga de placa, forme complejos entre los anticuerpos y A β en las muestras de tejido o afecte a la cognición.

Se ha demostrado que una ruta para el metabolismo de A β es la vía de transporte desde el SNC al plasma (Zlokovic, B.V., y col., Proc. Natt. Acad. Sci (EE.UU.) (1996) 93:4229-4234; Ghersi-Egea, J-F, y col., J. Neurochem. (1996) 67:880-883). Adicionalmente, se ha demostrado que A β en el plasma puede atravesar la barrera hemato-encefálica y entrar en el cerebro (Zlokovic, B. V., y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67:1034-1040). Se ha demostrado también que la administración de determinados anticuerpos A β policlonales y monoclonales disminuye la deposición de A β en las placas amiloides en el modelo de ratón transgénico APP^{V717F} de la enfermedad de Alzheimer (Bard, F., y col., Nature Med. (2000) 6:916-919); sin embargo, se dijo que esto es debido a determinados anticuerpos anti-A β que atraviesan la barrera sangre-cerebro estimulando la fagocitosis de las placas amiloides por las células microgliales. En los experimentos de Bard, los análisis de secciones de cerebro *ex vivo* demostraron que la presencia de anticuerpo A β añadido, junto con la microglía añadida exógenamente, indujo la fagocitosis de A β , dando como resultado la retirada de los depósitos de A β .

Los niveles tanto de A β ₄₀ soluble como de A β ₄₂ en el FCE y en la sangre pueden detectarse fácilmente usando análisis normalizados que usan anticuerpos dirigidos contra epítomos a lo largo de la cadena A β . Tales ensayos se han descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.766.846; n.º 5.837.672 y n.º 5.593.846. Estas patentes describen la producción de anticuerpos monoclonales murinos en el dominio central del péptido A β y se describió que tenían epítomos alrededor e incluyendo las posiciones 16 y 17. Se describieron también los anticuerpos dirigidos contra la región N-terminal. Se impusieron varios anticuerpos monoclonales para inmunorreaccionar con las posiciones 13 a 28 del péptido A β ; éstos no se unieron a las posiciones 17-28 representantes del péptido, por lo tanto, de acuerdo con las patentes citadas, estableciendo que es esta región, incluyendo las posiciones 16-17 (el sitio α -secretasa) la que era la diana de estos anticuerpos. Entre los anticuerpos conocidos que se unen entre los aminoácidos 13 y 28 del A β están los anticuerpos 266, 4G8 y 1 C2 de ratón.

Los presentes inventores han descubierto ahora inesperadamente que la administración del anticuerpo 266 restaura la cognición (memoria de objeto) muy rápidamente y casi por completo en ratones transgénicos hemicigotos (APP^{V717F}) de 24 meses. Todavía, el anticuerpo no presenta las propiedades que la técnica da a conocer que se necesitan para que un anticuerpo sea eficaz en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, del síndrome de Down y de otras enfermedades relacionadas con el péptido A β . Para mayor sorpresa, los presentes inventores observaron que los anticuerpos que se unen a A β entre las posiciones 13 y 28 (266 y 4G8) son capaces de secuestrar formas solubles de A β de su unión, formas circulantes en sangre y que la administración periférica del anticuerpo 266 produce la salida rápida de cantidades relativamente grandes de péptido A β desde el SNC al plasma. Esto da como resultado la eliminación alterada del A β soluble, la prevención de la formación de placas y, más sorprendentemente, la mejora de la cognición, sin reducir necesariamente siquiera la carga de la placa amiloidea A β , que atraviesa la barrera hemato-encefálica en cualquier medida significativa, decorando la placa, activando los mecanismos celulares o uniéndose con gran afinidad al A β agregado.

Divulgación de la invención

Los aspectos de la presente invención se exponen en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de estos aspectos se exponen en las reivindicaciones dependientes. La presente invención proporciona anticuerpos humanizados, o fragmentos de los mismos, que afectan positivamente la cognición en enfermedades y afecciones en los que puede estar implicado Ap, tal como en la enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica. Los anticuerpos o los fragmentos de los mismos no necesitan atravesar la barrera hemato-cerebral, decorar la placa amiloidea, activar las respuestas celulares o incluso reducir necesariamente la placa de la carga amiloidea. En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos, en los que las regiones variables tienen secuencias que comprenden el CDR del anticuerpo 266 de ratón y secuencias marco humanas específicas (secuencias SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 10), en las que el anticuerpo se une específicamente a un epítomo contenido dentro de las posiciones 13-28 del A β . En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos, en los que la cadena ligera es la SEQ ID NO: 11 y la cadena pesada es la SEQ ID NO: 12.

También se describen secuencias de polinucleótido que codifican los anticuerpos o fragmentos humanizados de los mismos desvelados anteriormente, los vectores que comprenden las secuencias de polinucleótido que codifican los anticuerpos humanizados o los fragmentos de los mismos, las células hospedadoras transformadas con los vectores o que incorporan los polinucleótidos que expresan los anticuerpos o fragmentos humanizados de los mismos, las

formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos descritas en el presente documento y los procedimientos de fabricación y utilización de los mismos.

5 Tales anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos son útiles para secuestrar A β en humanos; para tratar y prevenir enfermedades y afecciones caracterizados por placas A β o toxicidad de A β en el cerebro, tales como la enfermedad de Alzheimer; para diagnosticar estas enfermedades en humanos; y para determinar si un sujeto humano responderá al tratamiento que usa anticuerpos humanos contra A β .

10 La administración de un anticuerpo humanizado apropiado *in vivo* para secuestrar el péptido A β que circula en los fluidos biológicos es útil para el tratamiento preventivo y terapéutico de las afecciones relacionadas con la formación de placas difusas, neuríticas y cerebrovasculares que contienen A β en el cerebro. El anticuerpo humanizado, que incluye un fragmento inmunológicamente reactivo del mismo, da como resultado la retirada del péptido A β de los complejos macrocelulares que serían normalmente relevantes para transportarlo en los fluidos corporales a y desde los puntos en los que las placas pueden formarse o en los que pueden ser tóxicos. Además, el secuestro del péptido A β del plasma con el anticuerpo o fragmento del mismo se comporta como un "sumidero", que secuestra eficazmente el péptido A β soluble en el compartimento del plasma, y que induce a A β a introducirse en el plasma desde las posiciones en el sistema nervioso central (SNC). Al secuestrar A β en la sangre, aumenta el eflujo neto del cerebro y se evita que se deposite A β soluble en placas insolubles y que se formen especies tóxicas solubles en el cerebro. Además, puede retirarse del cerebro el A β insoluble en las placas que está en equilibrio con el A β soluble por un efecto secuestrante en la sangre. El secuestro del péptido A β con el anticuerpo también potencia su retirada del cuerpo e inhibe los efectos tóxicos del A β soluble en el cerebro y el desarrollo y la acumulación adicional de A β insoluble como amiloide en placas. Los anticuerpos útiles en la presente invención no atraviesan la barrera hemato-cerebral en grandes cantidades ($\leq 0,1$ % de niveles en plasma). Además, los anticuerpos humanizados utilizados en la presente invención, cuando se administran periféricamente, no necesitan producir una respuesta inmune celular en el cerebro cuando se unen a un péptido A β o cuando circulan libremente para obtener sus efectos beneficiosos. Además, cuando se administran periféricamente no necesitan unirse de forma apreciable al péptido A β agregado en el cerebro para tener sus efectos beneficiosos.

15 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para tratar o prevenir afecciones caracterizadas por la formación de placas que contienen proteína beta amiloidea en humanos, cuyo procedimiento comprende administrar, de forma preferente periféricamente, a un humano en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéutica o profiláctica eficaz de anticuerpo monoclonal humanizado o de un fragmento inmunológicamente reactivo del mismo, anticuerpo que se une específicamente a la región media del péptido A β . En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para inhibir la formación de placas amiloideas y para eliminar las placas amiloideas en humanos, cuyo procedimiento comprende administrar a un sujeto humano en necesidad de tal inhibición una cantidad eficaz de un anticuerpo humanizado que secuestra el péptido A β en su forma circulante en sangre e induce el eflujo fuera del cerebro así como la eliminación de A β alterado en plasma y en el cerebro. En aspectos adicionales, la presente invención se dirige a tales anticuerpos humanizados, incluyendo porciones inmunológicamente eficaces de los mismos, y a los procedimientos para su preparación.

20 La presente invención también incluye procedimientos para revertir el deterioro cognitivo, mejorar la cognición, tratar el deterioro cognitivo y prevenir el deterioro cognitivo en un paciente diagnosticado con enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica, comprendiendo administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo humanizado de la presente invención.

25 La presente invención también incluye el uso de un anticuerpo humanizado de la presente invención para la fabricación de un medicamento, que incluye la expresión prolongada de secuencias recombinantes del anticuerpo o el fragmento del anticuerpo en tejidos humanos, para tratar, prevenir o revertir la enfermedad de Alzheimer; para tratar, prevenir o contrarrestar el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica.

30 La presente invención se refiere a la observación sorprendente de que en un corto periodo de tiempo después de la administración de un anticuerpo de la presente invención, efluyen cantidades relativamente grandes de A β del sistema nervioso central a la sangre. De este modo, también se desvelan procedimientos para evaluar la respuesta de un sujeto humano al tratamiento con un anticuerpo que se une a A β o a un fragmento del mismo, que comprende: a) administrar el anticuerpo o un fragmento del mismo al sujeto; y b) medir la concentración de A β en la sangre del sujeto.

35 También se desvela un procedimiento para tratar un sujeto humano con un anticuerpo que se une a A β o un fragmento del mismo, que comprende: a) administrar una primera cantidad del anticuerpo o fragmento del mismo al sujeto; b) de 3 horas a dos semanas después de la administración de la primera dosis, medir la concentración de A β en la sangre del sujeto; c) si es necesario, calcular una segunda cantidad de anticuerpo o fragmento del mismo basándose en el resultado de la etapa b), cuya segunda cantidad es la misma o diferente a la de la primera cantidad; y d) administrar la segunda cantidad de anticuerpo o fragmento.

40 También se desvela un procedimiento para evaluar en un sujeto humano la eficiencia de un anticuerpo que se une a A β , o un fragmento del mismo, para inhibir o prevenir la formación de la placa A β amiloide, para reducir la placa A β amiloide, para reducir los efectos de la especie A β tóxica soluble o para tratar un trastorno o una afección

relacionada con la placa en A β , que comprende: a) obtener una primera muestra del plasma del paciente o de FCE; b) medir una concentración de línea basal de A β en la primera muestra; c) administrar el anticuerpo o un fragmento del mismo al sujeto; d) de 3 horas a dos semanas después de la administración del anticuerpo o del fragmento del mismo, obtener una segunda muestra del plasma del sujeto o de FCE; y e) medir la concentración de A β en la segunda muestra; en la que, la eficiencia está relacionada con la cantidad de A β unido al anticuerpo en sangre y con la concentración de A β en el FCE.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el porcentaje del péptido A β extraído del fluido cerebroespinal humano a través de una membrana de diálisis por Mab 266 en función del umbral de peso molecular de la membrana de diálisis.

La Figura 2 muestra la concentración de A β_{Total} encontrado en el plasma de un ratón transgénico APP^{V717F} después de la inyección de 200 μ g o 600 μ g de Mab 266 en función del tiempo.

La Figura 3A muestra la cantidad de deposición del péptido A β en la corteza cerebral en ratones transgénicos APP^{V717F} tratados con solución salina, IgG de ratón o Mab 266. La Figura 3B muestra la correlación de estos resultados con origen paterno.

La Figura 4 muestra las secuencias de polinucleótido para expresar la cadena ligera de 266 humanizado a partir del plásmido pVk-Hu266 y los códigos de aminoácido único para la cadena ligera expresada de 266 humanizado (correspondiente a la SEQ ID NO: 11 cuando está madura).

La Figura 5 muestra las secuencias de polinucleótido para expresar la cadena pesada de 266 humanizado a partir del plásmido pVg1-Hu266 y los códigos del único aminoácido para la cadena pesada expresada de 266 humanizado (correspondiente a la SEQ ID NO: 12 cuando está madura).

La Figura 6 es un mapa plasmídico de pVk-Hu266.

La Figura 7 es un mapa plasmídico de pVg1-Hu266.

Modos para llevar a cabo la invención

Los péptidos A β que circulan en los fluidos biológicos humanos representan la región carboxi terminal de una proteína precursora codificada en el cromosoma 21. Se ha informado a partir de los resultados de los experimentos *in vitro* que el péptido A β tiene poca solubilidad en soluciones fisiológicas, ya que contiene un tramo de aminoácidos hidrófobos que son una parte de la región que ancla su precursor más largo a las membranas lipídicas de las células. De este modo no es sorprendente que el péptido A β circulante esté complejoado normalmente con otros grupos que previenen su agregación. Esto ha dado como resultado dificultades para detectar el péptido A β circulante en los fluidos biológicos.

Los documentos de patentes anteriormente mencionados (patentes de EE.UU. n.º 5.766.846; n.º 5.837.672 y n.º 5.593.846) describen la preparación de anticuerpos, incluyendo un anticuerpo monoclonal, denominado clon 266 que aumentó frente, y se ha demostrado que se une específicamente a un péptido que comprende los aminoácidos 13-28 del péptido A β . Los presentes solicitantes han descubierto que los anticuerpos que se unen en esta región, en contraste con los anticuerpos que se unen en cualquier parte de la secuencia de aminoácido de A β , son capaces de secuestrar el péptido A β soluble muy eficazmente a partir de complejos macromoleculares. Este secuestro efectuará el flujo neto del péptido A β del SNC, alterará su eliminación en el SNC y en el plasma y reducirá su disponibilidad para la formación de la placa. De este modo, los anticuerpos de esta especificidad, modificados para reducir su inmunogenicidad convirtiéndolos en una forma humanizada, ofrecen la oportunidad de tratar, tanto profiláctica como terapéuticamente, afecciones que se asocian a la formación de placas beta-amiloideas. Estas afecciones incluyen, como se indicó anteriormente, la enfermedad de Alzheimer preclínica y clínica, el síndrome de Down y la angiopatía amiloidea cerebral preclínica y clínica.

Como se usa en el presente documento, la palabra "tratar" incluye el tratamiento terapéutico, donde ya se sabe que está presente la enfermedad que ha de tratarse y la profilaxis - es decir, la prevención de, o la mejora, del posible futuro comienzo de una enfermedad.

Por "anticuerpos monoclonales que se unen a la región media del péptido A β " se entienden los anticuerpos monoclonales (Mab o Mabs) que se unen a una secuencia de aminoácidos que representa un epítipo contenido entre las posiciones 13-28 de A β . La región completa no necesita marcarse como diana. Siempre que el anticuerpo se una al menos a un epítipo dentro de esta región (especialmente, por ejemplo, incluyendo el sitio 16-17 de la α -secretasa o el sitio en el que se une el anticuerpo 266), tales anticuerpos son eficaces en el procedimiento de la presente invención.

Por "anticuerpo" se entiende un anticuerpo monoclonal en sí mismo, o un fragmento del mismo inmunológicamente eficaz, tal como un fragmento F_{ab}, F_{ab}' , o F_{(ab)2} del mismo. En algunos contextos, en el presente documento, los fragmentos se mencionarán específicamente por énfasis; no obstante, se entenderá que independientemente de si los fragmentos se especifican, el término "anticuerpo" incluye tales fragmentos así como formas de una sola cadena. Siempre que la proteína retenga la capacidad para unirse específicamente a su diana deseada, y en este caso, para secuestrar el péptido A β de sus proteínas transportadoras en sangre, se incluye dentro del término "anticuerpo". También están incluidas dentro de la definición "anticuerpo" por ejemplo, las formas de una sola cadena, generalmente denominadas regiones FV, de los anticuerpos con esta especificidad. Preferentemente, pero no

necesariamente, los anticuerpos útiles en la presente invención se producen de forma recombinante, como manipulación de los anticuerpos típicamente murinos u otros no humanos con la especificidad apropiada que se necesita para convertirlos en la forma humanizada. Los anticuerpos pueden estar o no glucosilados, aunque se prefieren anticuerpos glucosilados. Los anticuerpos se reticulan de forma apropiada mediante enlaces disulfuro, como es bien sabido.

Se sabe que la unidad estructural básica de un anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50 a 70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente de la identificación del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican en gamma, mu, alfa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isótopo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. En las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos.

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. De este modo, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Las cadenas presentan todas la misma estructura general de regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR (por sus siglas en inglés). Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. Desde el N terminal hasta el C terminal, tanto las cadenas ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con convenciones bien conocidas [Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991; Chothia, y col., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia, y col., Nature 342:878-883 (1989)].

Como se sabe bien en la técnica, pueden generarse fácilmente anticuerpos monoclonales con especificidad apropiada por técnicas convencionales de inmunización de mamíferos, formando hibridomas a partir de las células productoras de anticuerpo de dichos mamíferos o de otra manera inmortalizándolas y cultivando los hibridomas o las células inmortalizadas para evaluar su especificidad apropiada. En el presente caso dichos anticuerpos podrían generarse inmunizando un ser humano, un conejo, una rata o un ratón, por ejemplo, con un péptido que representa un epítipo que abarca la región 13-28 del péptido A β o una subregión apropiada del mismo. Los materiales para la manipulación recombinante pueden obtenerse recuperando las secuencias de nucleótido que codifican el anticuerpo deseado del hibridoma o de otras células que lo producen. Estas secuencias de nucleótido pueden manipularse para proporcionarlas en forma humanizada.

Por "anticuerpo humanizado" se entiende un anticuerpo que se compone parcial o totalmente de secuencias de aminoácido derivadas de una línea germinal de anticuerpo humano alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) no humanas. Preferentemente, sin embargo, la región variable del anticuerpo e incluso la CDR está también humanizada por técnicas que se conocen bien actualmente en la técnica. Las regiones marco de las regiones variables están sustituidas por las regiones marco humanas correspondientes que dejan sustancialmente intactas las CDR no humanas, o incluso reemplazando la CDR con secuencias procedentes de un genoma humano. Se producen anticuerpos totalmente humanos en ratones modificados genéticamente cuyos sistemas inmunes se han alterado para que correspondan con los sistemas inmunes humanos. Como se menciona anteriormente, es suficiente para usar en los procedimientos de la presente invención, emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo los fragmentos que representan formas de una sola cadena.

Un anticuerpo humanizado se refiere de nuevo a un anticuerpo que comprende una región marco humana, al menos una CDR de un anticuerpo no humano y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90 %, preferentemente al menos un 95 % idéntica. Por lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las correspondientes partes de una o más secuencias humanas de inmunoglobulina nativa. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada no abarcaría normalmente un anticuerpo con región variable quimérica de ratón/región constante humana.

Los anticuerpos humanizados presentan al menos tres ventajas potenciales sobre los anticuerpos no humanos y los híbridos para su uso en terapia humana:

- 1) debido a que la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con otras partes del sistema inmune humano (por ejemplo, destruir las células diana más eficazmente por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o por citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)).
- 2) el sistema inmune humano no debería reconocer el marco o la región C del anticuerpo humanizado como extraño y por lo tanto la respuesta del anticuerpo contra dicho anticuerpo inyectado debería ser menos que

contra un anticuerpo no humano totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.

3) Se ha informado que los anticuerpos no humanos inyectados tienen una vida media en la circulación humana mucho más corta que la vida media de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán una vida media esencialmente idéntica a los anticuerpos humanos de origen natural, permitiendo que se administren dosis más pequeñas y menos frecuentes.

El diseño de inmunoglobulinas humanizadas puede llevarse a cabo como sigue. Cuando un aminoácido cae en la categoría siguiente, el aminoácido marco de una inmunoglobulina humana a usarse (inmunoglobulina aceptora) se reemplaza por un aminoácido marco de una inmunoglobulina no humana que proporciona CDR (inmunoglobulina donante):

- a) el aminoácido en la región marco humana de la inmunoglobulina aceptora es inusual para la inmunoglobulina humana en esa posición, mientras que el correspondiente aminoácido en la inmunoglobulina donante es típico en la inmunoglobulina humana en esa posición;
- b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a uno de los CDR; o
- c) cualquier átomo de la cadena lateral de un aminoácido marco está comprendido entre aproximadamente 5-6 angstroms (de centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de la CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional [Queen, y col., op. cit., y Co, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88, 2869 (1991)]. Cuando cada uno de los aminoácidos en la región marco humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es inusual en la inmunoglobulina humana en esa posición, un aminoácido tal se reemplaza por un aminoácido típico de la inmunoglobulina humana en esa posición.

El anticuerpo humanizado es una forma humanizada del anticuerpo 266 de ratón. Los CDR del 266 humanizado tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

cadena ligera CDR1:

```

      1           5           10           15
    Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
    (SEQ ID NO:1)
  
```

cadena ligera CDR2:

```

      1           5
    Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (SEQ ID NO:2)
  
```

cadena ligera CDR3:

```

      1           5
    Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr (SEQ ID NO:3)
  
```

cadena pesada CDR1:

```

      1           5
    Arg Tyr Ser Met Ser (SEQ ID NO:4)
  
```

cadena pesada CDR2:

```

      1           5           10           15
    Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly (SEQ
    ID NO:5)
  
```

y cadena pesada CDR3:

```

      1
    Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6) .
  
```

Una región variable de la cadena ligera preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en la que la región marco originada a partir de los segmentos DPK18 de la línea germinal Vk humana y del segmento J de Jk1, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos consenso en el mismo subgrupo V humano para reducir la inmunogenicidad potencial:

ES 2 611 427 T3

```

1           5           10           15
Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa

           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa

           35           40           45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro

           50           55           60
Gly Gln Ser Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val

           95           100           105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa

           110
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:7)

```

en la que:

- 5 Xaa en la posición 2 es Val o Ile;
- Xaa en la posición 7 es Ser o Thr;
- Xaa en la posición 14 es Thr o Ser;
- Xaa en la posición 15 es Leu o Pro;
- Xaa en la posición 30 es Ile o Val;
- Xaa en la posición 50 es Arg, Gln o Lys;
- 10 Xaa en la posición 88 es Val o Leu;
- Xaa en la posición 105 es Gln o Gly;
- Xaa en la posición 108 es Lys o Arg; y
- Xaa en la posición 109 es Val o Leu.

15 Una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo humanizado de un aspecto de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en la que la región marco originada a partir de los segmentos DP53 de la línea germinal VH humana y del segmento JH4 de J, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos consenso en el mismo subgrupo humano para reducir la inmunogenicidad potencial:

```

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

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

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

           50           55           60
Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr

           65           70           75
Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa

           80           85           90
Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp

           95           100           105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

           110
Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:8)

```

en la que:

- Xaa en la posición 1 es Glu o Gln;

ES 2 611 427 T3

- 5 Xaa en la posición 7 es Ser o Leu;
 Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser;
 Xaa en la posición 63 es Thr o Ser;
 Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val o Thr;
 Xaa en la posición 76 es Lys o Arg;
 Xaa en la posición 89 es Glu o Asp; y
 Xaa en la posición 107 es Leu o Thr.

10 Una región variable de la cadena ligera particularmente preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en la que la región marco originada a partir de los segmentos DPK18 de la línea germinal Vk humana y del segmento Jk1 de J, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos consenso en el mismo subgrupo V humano para reducir la inmunogenicidad potencial:

```

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

           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile

           35           40           45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro

           50           55           60
Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

           95           100          105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

           110
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:9).
  
```

15 Una región variable de la cadena pesada particularmente preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en la que la región marco originada a partir de los segmentos DP53 de la línea germinal VH humana y del segmento JH4 de J:

```

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

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

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

           50           55           60
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr

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

           80           85           90
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

           95           100          105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

           110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:10).
  
```

20 Una cadena ligera preferida para un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos:

ES 2 611 427 T3

```

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

           20           25           30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile

           35           40           45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro

           50           55           60
Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

           65           70           75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

           80           85           90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

           95           100          105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

           110          115          120
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val

           125          130          135
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala

           140          145          150
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

           155          160          165
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

           170          175          180
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

           185          190          195
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

           200          205          210
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

           215
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO:11)}.

```

Una cadena pesada preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos:

```

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

```

ES 2 611 427 T3

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

```

          320                325                330
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
          335                340                345
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
          350                355                360
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
          365                370                375
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
          380                385                390
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
          395                400                405
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
          410                415                420
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
          425                430                435
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
          440
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                (SEQ ID NO:12) .

```

5 Son posibles otras secuencias para las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos humanizados de la presente invención y para el 266 humanizado. Las inmunoglobulinas pueden tener dos pares de complejos de cadena ligera/cadena pesada, comprendiendo al menos una cadena que comprende regiones determinantes de complementariedad de ratón funcionalmente unidas a los segmentos de la región marco humana.

10 También se desvelan polinucleótidos recombinantes que codifican anticuerpos que, cuando se expresan, comprenden las CDR de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de la presente invención. En cuanto a la región marco humana, se compara una región marco o una secuencia de aminoácidos de la región variable de una inmunoglobulina no humana que proporciona la CDR con las secuencias correspondientes en una colección de secuencias con región variable de inmunoglobulina humana y se selecciona una secuencia que tiene un alto porcentaje de aminoácidos idénticos. En las Figuras 4 y 5 se dan polinucleótidos ejemplares, que comprenden en el código de expresión para las cadenas de polipéptidos las CDR de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 266 monoclonal. Debido a la degeneración del codón y a las sustituciones de aminoácidos no críticas, pueden sustituirse fácilmente otras secuencias de polinucleótidos por aquellas secuencias. Los polinucleótidos particularmente preferidos de la presente invención codifican anticuerpos, que cuando se expresan, comprenden las CDR de la SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6, o cualquiera de las regiones variables de las SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 10, o las cadenas ligera y pesada de las SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

20 Los polinucleótidos incluirán además típicamente una secuencia de polinucleótidos de control de expresión unida operativamente a las secuencias que codifican la inmunoglobulina humanizada, incluyendo las regiones del promotor asociadas de forma natural o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas, pero también pueden usarse las secuencias de control para hospedadores procariotas. Una vez el vector se ha incorporado a la línea celular del hospedador apropiada, la célula hospedadora se propaga en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos y, como es de desear, puede seguir la recogida y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina.

30 Las secuencias de nucleótidos capaces de expresar en última instancia los anticuerpos humanizados deseados pueden formarse a partir de una diversidad de diferentes polinucleótidos (ADNc o genómico, ARN, oligonucleótidos sintéticos, etc.) y componentes (por ejemplo, regiones V, J, D y C) así como a partir de una diversidad de técnicas diferentes. La unión de secuencias genómicas y sintéticas apropiadas es un procedimiento habitual de producción, pero pueden también utilizarse secuencias de ADNc.

35 Pueden aislarse secuencias de ADN de la región constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una diversidad de células humanas, pero preferentemente a partir de los linfocitos B inmortalizados. Las CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención derivarán similarmente de anticuerpos monoclonales no humanos capaces de unirse a un epítipo entre los aminoácidos 13 y 28 del péptido A β , cuyos anticuerpos monoclonales se producen en cualquier procedencia de mamífero adecuada, incluyendo, ratones, ratas, conejos u otros vertebrados capaces de producir anticuerpos por procedimientos bien conocidos, como se describe

anteriormente. Pueden obtenerse células de fuentes adecuadas para las secuencias de polinucleótidos y células hospedadoras para la expresión y secreción de inmunoglobulinas a partir de numerosas fuentes bien conocidas en la técnica.

5 Además de las inmunoglobulinas humanizadas descritas específicamente en el presente documento, pueden diseñarse fácilmente otras inmunoglobulinas modificadas "sustancialmente homólogas" y fabricarse utilizando diversas técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las regiones marco pueden variar desde las secuencias naturales en el nivel de la estructura primaria por varias sustituciones de aminoácidos, adiciones y deleciones terminales e intermedias y similares. Además, puede usarse una diversidad de diferentes regiones marco humanas solas o en combinación como base para las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención. En general, las modificaciones de los genes pueden realizarse fácilmente por una diversidad de técnicas bien conocidas, tales como la mutagénesis dirigida al sitio.

10 Alternativamente, pueden producirse fragmentos de polipéptido que comprenden solamente una porción de la estructura primaria del anticuerpo, cuyos fragmentos poseen una o más actividades de inmunoglobulina (por ejemplo la actividad de fijación del complemento). Estos fragmentos de polipéptido pueden producirse por escisión proteolítica de anticuerpos intactos por procedimientos bien conocidos en la técnica o insertando codones de terminación en las posiciones deseadas en los vectores que utilizan mutagénesis dirigida al sitio, tal como después de CH1 para producir fragmentos Fab o después de la región bisagra para producir fragmentos F(ab')₂. Pueden producirse anticuerpos de una sola cadena uniendo VL y VH con un conector de ADN.

15 Como se indica anteriormente, las secuencias de nucleótido codificadoras se expresarán en los hospedadores después que las secuencias se unen operativamente a (es decir, situadas para asegurar el funcionamiento de) una secuencia de control de expresión. Estos vectores de expresión se replican típicamente en los organismos hospedadores bien como episomas o bien como una parte íntegra del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

20 *E. coli* es un hospedador procariota particularmente útil para clonar los polinucleótidos de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis* y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariotas, también pueden fabricarse vectores de expresión, que contendrán normalmente las secuencias de control de expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, puede estar presente cualquiera de los numerosos promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de la lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias del sitio de unión al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

25 También pueden usarse otros microbios, tales como las levaduras, para la expresión. *Saccharomyces* es un hospedador preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfoglicerato-quinasa u otras enzimas glucolíticas y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares como es deseable.

30 Además de los microorganismos, también puede usarse el cultivo celular del tejido de mamíferos para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención. Realmente se prefieren las células eucariotas, porque se han desarrollado en la técnica numerosas líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas e incluyen las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, las líneas celulares del ovario del hámster sirio, células HeLa, preferentemente las líneas celulares del mieloma, linfocitos B transformados, líneas celulares del riñón embrionario humano o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tal como un origen de replicación, un promotor, un potenciador y si es necesario sitios de procesamiento de información, tales como los sitios de unión al ribosoma, los sitios de corte y empalme del ARN, los sitios de poliadenilación y las secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de expresión preferidas son los promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares.

35 Los vectores que contienen las secuencias de nucleótido de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera y las secuencias de control de expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro cálcico se utiliza normalmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato cálcico o electroporación puede usarse para otros hospedadores celulares.

40 Una vez expresados, pueden purificarse todos los anticuerpos, sus dímeros, las cadenas ligera y pesada individuales u otras formas de inmunoglobulinas de la presente invención de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, en fase inversa, en columna por interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares. Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95 % de homogeneidad y del 98 al 99 % o más de homogeneidad es la más preferida, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o

hasta homogeneidad como se desee, los polipéptidos pueden usarse después terapéutica o profilácticamente, como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos (incluyendo los fragmentos inmunológicamente reactivos) se administran a un paciente con riesgo de o que presenta síntomas o patología relacionados con A β tales como la enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica, el síndrome de Down o la angiopatía amiloidea clínica o preclínica, usando técnicas de administración convencionales, preferentemente administración periférica (es decir, no por administración al sistema nervioso central) por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. Aunque los anticuerpos pueden administrarse directamente en el sistema ventricular, el fluido espinal o el parénquima cerebral y las técnicas para tratar estas localizaciones son bien conocidas en la técnica, no es necesario utilizar estos procedimientos más difíciles. Los anticuerpos de la presente invención son eficaces cuando se administran por técnicas más sencillas que se basan en el sistema de circulación periférica. Las ventajas de la presente invención incluyen la capacidad del anticuerpo para ejercer sus efectos beneficiosos aun cuando no se proporcionen directamente al propio sistema nervioso central. De hecho, se ha demostrado en el presente documento que la cantidad de anticuerpo que atraviesa la barrera hemato-cerebral es <0,1 % de los niveles en plasma y que los anticuerpos de la presente invención ejercen su capacidad para secuestrar A β en la circulación periférica así como alterar el SNC y la eliminación de A β soluble en el plasma.

Las composiciones farmacéuticas para administración se diseñan para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado y los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como los agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares se usan según sea apropiado. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, última edición, proporciona un compendio de técnicas de formulación como se conocen generalmente por los médicos. Puede ser particularmente útil alterar las características de solubilidad de los anticuerpos de la presente invención, haciéndolos más lipófilos, por ejemplo, encapsulándoles en liposomas o bloqueando los grupos polares.

Se prefiere la administración sistémica periférica por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Los vehículos adecuados para dichas inyecciones son sencillos. Además, sin embargo, la administración puede efectuarse también a través de las membranas de la mucosa por medio de aerosoles nasales o supositorios. Las formulaciones adecuadas para dichos modos de administración son bien conocidas y típicamente incluyen tensioactivos que facilitan la transferencia a través de la membrana. Tales tensioactivos con frecuencia derivan de esteroides o son lípidos catiónicos, tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o diversos compuestos tales como hemisuccinato de colesterol, fosfatidil glicerol y similares.

La concentración de anticuerpo humanizado en las formulaciones es tan baja como aproximadamente el 0,1 % a como mucho el 15 o el 20 % en peso y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes, viscosidades del fluido y así sucesivamente, según el modo concreto de administración seleccionado. De este modo, se podría preparar una composición farmacéutica típica para inyectables que contenga 1 ml de agua tamponada esterilizada de solución tamponada con fosfato y 1 a 100 mg del anticuerpo humanizado de la presente invención. La formulación podría filtrarse esterilizada después de preparar la formulación, o de otra manera hacerla microbiológicamente aceptable. Una composición típica para infusión intravenosa podría tener un volumen como mucho de 250 ml de fluido, tal como una solución de Ringer esterilizada, y 1-100 mg por ml o más de concentración de anticuerpo. Los agentes terapéuticos de la presente invención pueden congelarse o liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo estéril adecuado antes de usar. La liofilización y la redisolución pueden dar lugar a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo (por ejemplo con inmunoglobulinas convencionales, anticuerpos IgM que tienden a tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos de IgG). Las dosificaciones pueden tener que ajustarse para compensar. El pH de la formulación se seleccionará para equilibrar la estabilidad del anticuerpo (química y física) y aliviar al paciente cuando se le administra. Generalmente, se tolera un pH entre 4 y 8.

Aunque los procedimientos anteriores parecen los más convenientes y más apropiados para la administración de proteínas tales como anticuerpos humanizados, mediante adaptación adecuada, pueden emplearse otras técnicas de administración, tales como la administración transdérmica y la administración oral con la condición de que se diseñe la formulación apropiada.

Además, puede ser deseable emplear formulaciones de liberación controlada usando películas y matrices biodegradables o mini-bombas osmóticas o sistemas de transporte basados en perlas de dextrano, alginato o colágeno.

En resumen, las formulaciones están disponibles para administrar los anticuerpos de la presente invención y se conocen bien en la técnica y pueden elegirse de una diversidad de opciones.

Los niveles de dosificación típicos pueden optimizarse usando técnicas clínicas convencionales y dependerán del modo de administración y de la afección del paciente.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar pero no limitar la presente invención.

Los ejemplos a continuación en el presente documento emplean, entre otros, un anticuerpo monoclonal murino denominado "266" que se preparó originalmente por inmunización con un péptido compuesto por los restos 13-28 del péptido A β humano. Se confirmó que el anticuerpo inmunorreacciona con este péptido, pero se describió previamente que no reacciona con el péptido que contiene solo los restos 17-28 del péptido A β humano, o con cualquiera de los demás epítomos en el mismo péptido A β . La preparación de este anticuerpo se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.766.846, incorporada en el presente documento por referencia. Como los ejemplos describen en el presente documento los experimentos realizados en los sistemas murinos, el uso de anticuerpos monoclonales murinos es satisfactorio. Sin embargo, en los procedimientos de tratamiento de la presente invención destinados a uso humano, se prefieren las formas humanizadas de los anticuerpos con la correspondiente inmunoespecificidad del anticuerpo 266.

Ejemplo 1

Secuestro del péptido A β añadido en fluidos humanos

Se incubaron muestras de fluido cerebroespinal humano (FCE) (50 μ l) y plasma humano (50 μ l) durante 1 hora a temperatura ambiente como sigue:

1. solo;
2. junto con 5 ng de péptido A 40; o
3. 5 ng de péptido A 40 más 1 mg de anticuerpo 266 monoclonal (descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 5.766.846).

Se realizó la electroforesis de las muestras en un gel con gradiente 4-25 % no desnaturalizante, es decir, electroforesis con gradiente no desnaturalizante (NDGGE) y se transfirieron a nitrocelulosa. Las transferencias se tiñeron después con Ponceau S o, para transferencia Western, se sondaron con anticuerpo monoclonal (3D6) marcado con biotina que se dirige contra los primeros cinco aminoácidos del péptido A β , se desarrollaron con peroxidasa de rábano picante con estreptavidina y se detectaron por la quimioluminiscencia potenciada (ECL por sus siglas en inglés). Se estimaron los diámetros hidratados de los materiales contenidos en las bandas en las transferencias utilizando marcadores de peso molecular de Pharmacia. De este modo, si el péptido A β se une a otras moléculas, lo haría con el tamaño del complejo resultante.

Las transferencias Western de FCE ya sea con o sin 5 ng de péptido A β no muestran evidencias del péptido A β en respuesta a la detección mediada por el anticuerpo 3D6. Se obtienen resultados similares para el plasma humano. Esto es cierto a pesar de que el péptido A β podría detectarse por SDS-PAGE seguido de transferencia Western usando la misma técnica y en las mismas muestras de FCE. Supuestamente, la detección del péptido A β se impidió por interacciones entre este péptido y otros factores en los fluidos ensayados. Sin embargo, cuando se añade Mab 266 a la incubación, están presentes bandas características que representan el péptido A β secuestrado complejo con el anticuerpo tanto en plasma como en FCE. La banda principal está en aproximadamente 11 nm de diámetro hidratado, correspondiente al monómero del anticuerpo con una banda adicional más pequeña a 13 nm correspondiente al dímero del anticuerpo.

Ejemplo 2

Especificidad del anticuerpo secuestrarte

Se usaron muestras que contenían 50 μ l de FCE humano o 10 μ l de FCE de APP^{V717F}. APP^{V717F} son ratones transgénicos que representan un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer en los cuales se expresa el transgen de la proteína del precursor amiloideo humano con una mutación de la enfermedad familiar de Alzheimer y da como resultado la producción del péptido A β humano en el sistema nervioso central.

Las muestras se incubaron con o sin varios Mabs (1 μ g) durante 1 hora a temperatura ambiente y después se realizó la electroforesis en un NDGGE del 4-25 % y transfirió sobre microcelulosa como se describe en el Ejemplo 1. Los anticuerpos fueron como sigue:

- Mab 266 (se une a las posiciones 13-28);
- Mab 4G8 (se une a las posiciones 17-24);
- QCBpan (policlona de conejo para las posiciones 1-40);
- IgG de ratón (no específica);
- Mab 3D6 (se une a las posiciones 1-5);
- Mab 21F12 (se une a las posiciones 33-42);
- Mab 6E10 (se une a las posiciones 1-17); y
- QCB_{40,42} (policlona de conejo para A β ₄₀ y A β ₄₂).

La detección del complejo anticuerpo péptido A β fue como se describe en el Ejemplo 1 - 3D6 marcado con biotina (al péptido A β N-terminal) seguido de estreptavidina-HRP y ECL. La detección similar en FCE humano incubado con Mab 266, en algunos casos sustituyó a QCB_{40,42}, que se une al extremo carboxilo del péptido A β , por 3D6.

Los resultados mostraron que de los anticuerpos ensayados, solamente Mab 4G8 y Mab 266 permitieron la detección del péptido A β .

- 5 Los resultados demostraron que para el FCE humano, únicamente Mab 266 y Mab 4G8 pudieron secuestrar en cantidades detectables un complejo A β de anticuerpo (de nuevo, sin ningún anticuerpo, no se detecta A β). Mab 266 también fue capaz de producir resultados similares a los obtenidos con el FCE humano con FCE de ratones transgénicos APP^{V717F}. El péptido A β podría secuestrarse en el FCE humano utilizando Mab 266 independientemente de si se utilizó anticuerpo 3D6 o QCB_{40,42} para desarrollar la transferencia Western.

Ejemplo 3

Demostración del complejo péptido A β -266 por electroforesis bidimensional

- 10 Se incubó una muestra que contenía 50 ng de péptido A β ₄₀ con 2 μ g de Mab 266 a 37 °C durante 3 horas. Se utilizó una incubación correspondiente de Mab 266 solo como control.

Las muestras se sometieron después a electroforesis bidimensional en gel.

- 15 En la primera dimensión, las muestras incubadas se sometieron a NDGGE como se describe en el Ejemplo 1. El gel de poliacrilamida se cortó después en carriles individuales perpendiculares a la dirección del primer flujo dimensional y se realizó la separación del gel en condiciones desnaturalizantes/reductoras por SDS-PAGE (gel de tricina urea) en la segunda dimensión. Se detectó la presencia de las bandas bien por tinción de Ponceau-S (cualquier proteína) o bien por desarrollo específico usando 6E10 Mab (Senetek, Inc.) y A β anti-ratón biotinilado en el sistema de detección basado en HRP.

- 20 La tinción de Ponceau-S de las transferencias en nitrocelulosa después de la transferencia permitió la visualización de las cadenas pesada y ligera de Mab 266 solas. Se confirmó que el péptido A β estaba en un complejo con Mab 266 como una banda a 4 kD, se observó que se alinea con el tamaño del Mab 266 completo observado después de la NDGGE de la primera dimensión.

Ejemplo 4

Demostración de la no equivalencia de unión y secuestro

- 25 Se cree que el péptido A β a medida que circula en el plasma y en el FCE está contenido en un complejo con proteínas, incluyendo apolipoproteína E. El presente ejemplo demuestra que los anticuerpos contra apoE, aunque pueden unirse al complejo, no secuestran apoE del resto del complejo.

- 30 Se incubaron complejos apoE (500 ng) con Mab o anticuerpos policlonales contra apoE (2 μ g) a 37 °C durante una hora. Las muestras incubadas se sometieron a continuación a NDGGE usando las técnicas descritas en el Ejemplo 1. Después de NDGGE, se realizó la transferencia Western con anticuerpos anti-apoE de cabra purificados por afinidad con detección por ECL. Cuando no está presente el anticuerpo, puede detectarse apoE a 8-13 nm coherente con su presencia en las partículas de lipoproteína. La presencia de anticuerpos monoclonales o policlonales contra apoE produce un desplazamiento de la población de apoE a una especie molecular mayor, un "súper desplazamiento". Esto demuestra que los anticuerpos contra apoE no secuestraron, es decir, retiraron apoE de una partícula de lipoproteína, en lugar de unirse a apoE en las lipoproteínas creando una especie molecular mayor.

Ejemplo 5

El secuestro de A β no está alterado por anticuerpos anti-apoE

- 40 Se incubó una muestra de 100 μ l de FCE humano con Mab 266 solo o con anti-apoE policlinal o con ambos anticuerpos durante 60 minutos a 37 °C. Se analizaron a continuación las muestras por NDGGE como se describe en el Ejemplo 1 y se realizó la detección de las bandas como se describe en el Ejemplo 1.

- 45 Los resultados muestran que añadiendo Mab 266 a la muestra, la banda de aproximadamente 11 nm de diámetro característica del complejo del péptido 266-A β secuestrado era visible. Esto es en caso de que el anti-apoE esté o no presente. Esta banda, que demuestra A β secuestrado, también aparece si se añade 50 ng de A β a la mezcla de incubación en presencia de Mab 266. De este modo, la alteración del peso molecular de apoE en presencia de anticuerpos anti-apoE no interfiere con el secuestro del péptido A β por Mab 266.

Ejemplo 6

Secuestro del péptido A β *in vivo*

- 50 A. Los ratones APP^{V717F} transgénicos, denominados también ratones PDAPP, sobreexpresan una forma mutante de proteína APP humana. Estos ratones producen A β humano en el SNC y tienen niveles elevados de péptido A β humano circulando en el FCE y en plasma. Se inyectaron ratones de 8 meses por vía intravenosa con

solución salina o con 100 µg de Mab 266. Se extrajo sangre 10 minutos después de la inyección inicial y de nuevo a las 20 horas después de la inyección inicial.

Se analizaron las muestras que contenían 20 µl de plasma de cada animal por NDGGE y transferencia Western con anticuerpo 3D6 como se describe en el Ejemplo 1. Los animales inyectados con solución salina no mostraron la presencia del péptido Aβ secuestrado de 11 nm característica después de 10 minutos o 20 horas. Sin embargo, los dos animales a los que se inyectó con Mab 266 mostraron la apariencia de esta banda después de 20 horas.

B. En este estudio se usaron ratones APP^{V717F} de dos meses. El día cero, los ratones no recibieron ni Mab 266, ni 1 mg de Mab 266 ni 100 µg de este anticuerpo. Se extrajeron muestras de plasma dos días antes de la administración de los anticuerpos y los días 1, 3, 5 y 7. Se sometieron las muestras de plasma a NDGGE seguido de transferencia Western y detección con 3D6 como se describe en el Ejemplo 1. Se detectó el complejo 266/Aβ en todos los puntos de tiempo después de la administración de Mab 266 a menos que la muestra de plasma se hubiera tratado con proteína G, que se une a la inmunoglobulina, eliminando de este modo eficazmente el Mab 266. Se encontraron niveles coherentes del complejo durante el periodo de tiempo ensayado excepto para una pequeña disminución el séptimo día en los animales inyectados con 100 µg de Mab 266; en general, los niveles en los animales a los que se administraron 100 µg fueron consistentemente menores que los observados en los ratones a los que se administró 1 mg de este anticuerpo.

C. Se administró a dos ratones APP^{V717F} de dos meses 1 mg de Mab 266 por vía intravenosa y se extrajo una muestra de 25 µl de plasma de cada uno. Se sometió la muestra de plasma a NDGGE seguido de transferencia Western como se describió anteriormente excepto que la unión con 3D6 biotinilado se siguió por detección con estreptavidina ¹²⁵I (Amersham) y exposición a una pantalla de imagen fosforescente. Se estimó el nivel de complejo en comparación con una curva patrón utilizando cantidades conocidas de Aβ40 complejoado con concentraciones de saturación de Mab 266 y se detectó similarmente. Se estimó la cantidad de péptido Aβ unido a Mab 266 a aproximadamente 100 ng/ml, representando un aumento de aproximadamente 1.000 veces sobre el péptido Aβ endógeno en estos ratones a los que se había determinado que era aproximadamente 100 pg/ml. Esta es también similar a la concentración del péptido Aβ en el cerebro de APP^{V717F} antes de la deposición de Aβ (50 a 100 ng/g); APP humano y Aβ humano en ratones APP^{V717F} Tg se producen casi solamente en el cerebro. De este modo, parece que la presencia de Mab 266 en el plasma actúa como un sumidero de péptido Aβ facilitando el flujo neto de péptido Aβ del SNC hacia el plasma. Este flujo neto aumentado resulta probablemente tanto de aumentar la salida de Aβ del SNC al plasma como también de prevenir que el Aβ en plasma vuelva a entrar al cerebro.

Se confirmó el tamaño correcto para el péptido Aβ secuestrado corriendo 20 µl de muestras de plasma obtenidas de ratones APP^{V717F} 24 horas después de haberse inyectado con 1 mg Mab 266 en geles de SDS-PAGE con TRIS-tricina seguido de transferencia Western utilizando anticuerpo 6E10 anti-Aβ antes o después de la exposición a la proteína G usando perlas unidas a la proteína G. Se detectó una banda que fue eliminada por la proteína G a 4-8 kD, acorde con la presencia de monómeros y posiblemente dímeros del péptido Aβ.

D. Se trataron ratones APP^{V717F} de dos meses con PBS (n=7) o 500 µg de Mab 266 biotinilado, es decir, m266B (n=9) por vía intraperitoneal. Tanto antes de como 24 horas después de la inyección, se analizó el péptido Aβ total en plasma usando una modificación del procedimiento ELISA de Jonhson-Wood, K., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1997) 94:1550-1555; y Bales, K.R., y col., Nature Genet (1997) 17:263-264. Se midió el Aβ total unido a m266B usando placas ópticas de 96 pocillos (Packard, Inc.) recubiertas con m3D6. Las muestras de plasma diluidas y los patrones (concentraciones variables de Aβ40 y m266B) se incubaron toda la noche en placas recubiertas y se determinó la cantidad de complejo Aβ/m266B total utilizando ¹²⁵I-estreptavidina. Además, en el punto de tiempo de 24 horas, se trataron en primer lugar las muestras de plasma con proteína G para cuantificar el péptido Aβ no unido a Mab 266 y se determinó Aβ_{Total} y Aβ₄₂ por ELISA en el FCE. En los animales inyectados con PSB, los niveles de péptido Aβ en el plasma fueron 140 pg/ml tanto antes como después de la inyección. Los niveles en plasma fueron similares en los ratones inyectados con Mab 266 antes de la inyección, pero las concentraciones de péptido Aβ no unido a Mab 266 fueron indetectables 24 horas después de la inyección.

También se midieron los niveles en el FCE, el FCE representa un compartimento extracelular dentro del SNC y la concentración de las moléculas en el FCE refleja en cierta medida la concentración de las sustancias en el espacio extracelular del cerebro. Se aisló FCE del compartimento de la cisterna magna. Se anestesiaron ratones con pentobarbital y se retiró la musculatura de la base del cráneo hasta la primera vértebra. Se recogió el FCE por punción cuidadosa de la membrana aracnoides que cubre la cisterna con una microaguja en un microscopio de disección y extrayendo el FCE con una micropipeta de polipropileno. 24 horas después de la inyección, se observó un aumento del péptido Aβ total en el FCE de los ratones inyectados con Mab 266 y se obtuvo aproximadamente un aumento al doble en Aβ₄₂ en comparación con los ratones inyectados con PBS en el FCE. Esto se confirmó utilizando electroforesis en gel desnaturalizante seguida de transferencia Western con anticuerpo 21F12 específico de Aβ₄₂.

En un experimento adicional, se inyectaron ratones APP^{V717F} Tg de tres meses con PBS o bien Mab 266 por vía intravenosa y se evaluaron las concentraciones tanto de Aβ₄₀ como de Aβ₄₂ en el FCE como sigue:

Para la medición de Aβ₄₀, se utilizó el anticuerpo monoclonal m2G3, específico de Aβ₄₀. Se modificó el ELISA descrito (Jonhson-Wood, K., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1997) 94:1550-1555) en un RIA reemplazando el

reactivo estreptavidina-HRP por ^{125}I -estreptavidina. Para las muestras de plasma y FCE, se realizó el procedimiento en condiciones no desnaturizantes que carecen de guanidina en los tampones. Para la evaluación del carbonato soluble y del A β insoluble en homogeneizado de cerebro, se homogeneizaron muestras con carbonato 100 nM, NaCl 40 mM, pH 11,5 (4 °C), se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min y se evaluó el A β en el sobrenadante (soluble) y en las fracciones de sedimento (insoluble) según describe (Johnson-Wood, K., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1997) 94:1550-1555) y se citó en la lista anteriormente. Se realizó la medición del complejo A β /Mab 266 en el plasma por RIA modificado. Se inyectaron ratones con Mab 266 biotinilado (Mab 266B) y se aisló plasma en diversos puntos de tiempo. Se midió el A β total unido a Mab 266 utilizando placas ópticas de 96 pocillos (Packard, Inc.) recubiertas con m3D6. Se incubaron muestras de plasma diluido y patrones (concentraciones variables de A β_{40} y de Mab 266B) toda la noche en las placas recubiertas y se determinó la cantidad de complejo A β /Mab 266B total mediante el uso de ^{125}I -estreptavidina.

Tres horas después de la inyección intravenosa de Mab 266, hubo un aumento del doble de los niveles de A β_{40} en FCE y un aumento no significativo en A β_{42} . Sin embargo, tanto a las 24 como a las 72 horas hubo un aumento del doble o triple tanto en A β_{40} como en A β_{42} en el FCE. Se obtuvieron resultados similares utilizando análisis de gel desnaturizante seguido de transferencia Western en A β del FCE mezclado. El flujo de A β a través del fluido intersticial del cerebro, que se refleja en cierto grado en los niveles de FCE, justifica probablemente el aumento observado en A β de FCE.

Es significativo que el cambio en los niveles del péptido A β en FCE no puede deberse a la introducción de Mab 266 en el FCE ya que las concentraciones medidas 24 horas después de la inyección, que son menores al 0,1 % de las concentraciones en el plasma de Mab 266, son insuficientes para justificar los cambios. Estos resultados sugieren que el péptido A β se extrae desde el parénquima cerebral en el FCE por la presencia del anticuerpo en el torrente sanguíneo.

Se midieron las formas de péptido A β que son solubles en PBS o en tampón de carbonato en homogeneizados corticales del cerebro en los mismos ratones a los que se había inyectado con Mab 266 y en los que se analizaron en el FCE como se describió anteriormente. Se observaron aumentos similares en estas formas solubles en los homogeneizados corticales.

Ejemplo 7

Mab 266 actúa como sumidero del péptido A β *in vitro*

Se construyó una cámara de diálisis como sistema *in vitro* para determinar la capacidad de Mab 266 para actuar como sumidero del péptido A β . Se colocó un ml de FCE humano en la cámara superior de un tubo de polipropileno separada por una membrana de diálisis con un umbral específico del orden de 10-100 kD en una cámara en el fondo que contenía 75 μl de PBS con o sin 1 μg de Mab 266.

Parece que se alcanzó el equilibrio después de 3 horas, según se determinó al someter al material en la cámara de fondo a geles de urea ácidos seguido de transferencia Western para el péptido A β con 6E10 en varios puntos de tiempo. Se desnaturalizaron las muestras en ácido fórmico hasta una concentración final del 80 % (vol/vol) y se redujeron con β -mercaptoetanol (1 %). Se realizó la electroforesis de las muestras (ánodo a cátodo) en ácido acético 0,9 M pasando el tampón de gradiente de gel de poliacrilamida desde un 4% al 35% conteniendo urea 6 M, ácido acético glacial al 5 % (vol/vol) y TEMED al 2,5 %. Se neutralizó el pH ácido del gel antes de transferir a la nitrocelulosa. Posteriormente, se utilizaron técnicas de transferencia Western habituales para identificar A β . Las bandas detectadas corresponden a 4 kD.

La cantidad de A β eliminada de la cámara superior se determinó de este modo por análisis ELISA tanto de la cámara superior como inferior (n=4) después de 3 horas. En la Figura 1 se muestran los resultados de varios umbrales de peso molecular en presencia y ausencia de Mab 266. Como se muestra, mientras que solamente cantidades mínimas de péptido A β atravesaron la membrana cuando se colocó PBS en la cámara inferior, se secuestró el 50 % del péptido A β en la cámara del fondo cuando Mab 266 estaba presente y el umbral de peso molecular era de 25 kD; cantidades crecientes atravesaron a medida que el umbral de peso molecular aumentaba hasta 100 kD, cuando casi el 100 % del péptido A β se extrajo a través de la membrana.

Se observó también que los anticuerpos 3D6 y 10D5 de A β anti-N-terminal fueron capaces de extraer el péptido A β a través de la membrana en este sistema, aunque no pudieron secuestrar el péptido A β en los ensayos descritos en el Ejemplo 1. Estos resultados demuestran que los anticuerpos contra el péptido A β tienen suficiente afinidad en estas condiciones para secuestrar el péptido en soluciones fisiológicas distintas de otras proteínas de unión, pero que los Mab tales como 266 que son inmunorreactivos con un epítipo en las posiciones 13-28 son sustancialmente más eficaces y se unen con mayor afinidad.

En ensayos similares, apoE4 segregada por astrocitos que se purificó según describe DeMattos, R.B., y col., J. Biol. Chem. (1998) 273:4206-4212; Sun, Y., y col., J. Neurosci. (1998) 18:3261-3272, tuvo un pequeño efecto estadísticamente significativo al aumentar la masa del péptido A β en la cámara inferior. No se observó ningún efecto aparente cuando IgG o BSA policlonales se sustituyeron por Mab 266.

Ejemplo 8Flujo de péptido A β en el plasma en el SNC

- 5 A. Se disolvió 1 μ g de A β ₄₀ en 5 μ l de FCE de rata para mantenerlo soluble y después se inyectó en el espacio subaracnoideo de la cisterna magna de ratones Swiss-Webster tipo silvestre que habían recibido anteriormente inyecciones IV de PBS (n=3) o 200 μ g de Mab 266 (n=3) biotinilado. En diferentes puntos de tiempo siguiendo el tratamiento, se determinó A β _{Total} en plasma de los ratones por ELISA de A β , utilizando 3D6 como anticuerpo de recubrimiento y patrones de A β mezclados con un exceso de 266 biotinilado. Cada muestra de plasma se enriqueció con un exceso de 266 biotinilado después de la extracción en cada animal para la detección de A β en ELISA. En los ratones inyectados con PBS, se detectaron cantidades mínimamente detectables del péptido a niveles de 0,15 ng/ml como valores pico después de 30-60 minutos, después de lo cual los niveles fueron prácticamente cero. En los ratones a los que se administró Mab 266, sin embargo, el péptido A β en plasma alcanzó niveles 330 veces mayores que las detectadas en los ratones inyectados con PBS después de 60 minutos (aproximadamente 50 ng/ml) y alcanzaron valores de aproximadamente 90 ng/ml después de 180 minutos.
- 10 B. Se repitió este procedimiento usando bien 200 μ g (n=3) o 600 μ g (n=3) inyectado IV en ratones APP^{V717F} de dos meses. Se inyectó Mab 266 por vía intravenosa en ratones APP^{V717F} +/+ de 3 meses con las dosis anteriores. Antes y en diferentes puntos de tiempo después de la inyección intravenosa, se determinó por RIA la concentración en plasma de A β unido a Mab 266. Los resultados detallados en un ratón ilustrativo se muestran en la Figura 2.
- 15 Se descubrió que la concentración de A β ligado en el anticuerpo monoclonal Mab 266 aumentó desde niveles basales de 150 pg/ml a niveles mayores de 100 ng/ml durante cuatro días. Analizando los puntos de tiempo tempranos en la curva, se determinó que la velocidad neta de entrada de A β _{Total} en el plasma de ratones APP^{V717F} Tg fue 42 pg/ml/minuto en presencia de concentraciones de saturación del anticuerpo.
- 20 Los efectos de Mab 266 sobre las concentraciones de A β en el plasma tanto en ratones salvajes como APP^{V717F} Tg así como los efectos del anticuerpo sobre la concentración de A β en FCE demuestra que la presencia de Mab 266 en circulación produce un cambio en el equilibrio del flujo de A β o en el transporte entre el SNC y el plasma.
- 25

Ejemplo 9Efecto de Mab 266 sobre A β en el cerebro

- 30 Se trataron ratones APP^{V717F} +/+ de cuatro meses cada 2 semanas durante 5 meses con inyecciones por vía intraperitoneal de solución salina, Mab 266 (500 μ g) o IgG para ratón control (100 μ g, Pharmigen). Se sacrificaron los ratones a los nueve meses de edad y se determinó la deposición de A β en la corteza cerebral. Se cuantificó el % de área cubierta por inmunorreactividad de A β , identificada con un anticuerpo pan-A β de conejo (QCB, Inc.), en la corteza cerebral cubriendo el hipocampo dorsal tal como describe Holtzman, D.M, y col., Ann. Neurol. (2000) 97:2892-2897. Los resultados se muestran en la Figura 3A. A esta edad, aproximadamente la mitad de cada grupo no había comenzado todavía a desarrollar la deposición de A β . Sin embargo, el % de ratones con >50 % de carga de A β en la corteza cerebral fue significativamente menor (P=0,02, prueba de Chi cuadrado) en el grupo tratado con 266. Aunque los ratones APP^{V717F} pueden desarrollar grandes cantidades de depósitos de A β en nueve meses, existe gran variabilidad en aproximadamente el 50 % que no presentan depósitos y aproximadamente el 50 % que presentan depósitos sustanciales. En los animales tratados con PBS e IgG, 6/14 y 5/13 ratones tenían más del 50 % de la corteza cerebral recubierta por tinción de A β , mientras que solamente uno de los 14 ratones tratados con Mab 266 tenía este nivel de coloración. Casi el 50 % de los animales en todos los grupos todavía no había desarrollado deposición de A β a los 9 meses. Esto último parece deberse al origen parental de cada ratón en nuestra cohorte ya que aun cuando todos los ratones estudiados se confirmó que eran APP^{V717F+/+}, se observaron grandes niveles de deposición de A β solamente en los ratones procedentes de 4/8 parejas de crías (camadas con alta patología). Los ratones procedentes de las otras 4 parejas de cría estaban prácticamente exentos de depósitos de A β (camadas con baja patología). Utilizando el origen parental como covariable, existía un fuerte efecto significativo de m266 en la reducción de la deposición de A β (p=0,0082, Fig. 3B).
- 35
- 40
- 45

Ejemplo 10El Mab 266 inyectado periféricamente no se une a las placas en ratones APPV717F Tg

- 50 Para determinar si el Mab 266 inyectado por vía intraperitoneal durante 5 meses se unió A β en el cerebro, se utilizaron secciones de cerebro de ratones APP^{V717F+/+} Tg de 9 meses que contenían depósitos A β y habían sido tratados ya sea con Mab 266, solución salina o IgG control. Se realizó el procesamiento del tejido y la inmunotinción como se describe (Bales, K.R., y col., Nature Genet. (1997) 17:263-264). Se incubó tejido de todos los grupos de animales con IgG anti-ratón marcado con fluoresceína (Vector, Inc.) y después se examinó al microscopio de fluorescencia. No se observó ninguna tinción específica de depósitos de A β en ninguno de los grupos. En cambio, cuando se aplicó Mab 266 a las secciones antes de la incubación de las secciones con IgG anti-ratón, se detectaron claramente depósitos de A β .
- 55

Ejemplo 11Efecto de la administración de anticuerpo 266 en el conocimiento en ratones PDAPP hemizigotos, transgénicos de 24 meses

Se usaron 16 ratones transgénicos hemizigotos (APP^{V717F}). Los ratones tenían aproximadamente 24 meses al comienzo del estudio. Todas las inyecciones fueron por vía intraperitoneal (i.p.). La mitad de los ratones recibieron inyecciones semanalmente de solución salina tamponada con fosfato (PBS, "Control") y la otra mitad recibió 500 microgramos de anticuerpo 266 de ratón disuelto en PBS. Las inyecciones se administraron durante un periodo de siete semanas (42 días) para un total de seis inyecciones. Tres días después de la última inyección, se evaluó el comportamiento de los animales utilizando una tarea de reconocimiento de objetos, esencialmente como se describe en J.-C. Dodart, y col., Behavioral Neuroscience, 113 (5) 982-990 (1999). Se calculó un índice de reconocimiento ($(T_b - T_a) / (T_b + T_a) \times 100$). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Estadísticas descriptivas del índice de reconocimiento

	N	Índice de reconocimiento (minutos)		
		Media	Desviación estándar	Error estándar
Control (PBS)	8	71,2**	8,80	3,11
Anticuerpo 266	8	54,35	7,43	2,62

**p=0,0010

La administración de 500 microgramos de anticuerpo 266 a la semana a ratones transgénicos, hemizigotos, de 24 meses se relacionó con un cambio significativo en el comportamiento. Los ratones transgénicos tratados con anticuerpo presentaban índices de reconocimiento que eran similares a los animales de control salvajes [J.-C. Dodart, y col.,]. La diferencia en el índice de reconocimiento era estadísticamente significativa en el nivel de probabilidad de 0,001. El aumento del índice de reconocimiento es una indicación de que el tratamiento con un anticuerpo que se une al péptido beta amiloideo en la región de los aminoácidos 13-28 invertirá las alteraciones de comportamiento que se habían documentado en este modelo de enfermedad de Alzheimer de ratón. Por consiguiente, la administración de anticuerpos que se unen al péptido beta amiloideo en la región de los aminoácidos 13-28 tratará enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down e interrumpirá la disminución cognitiva relacionada normalmente con la evolución de la enfermedad.

Se cuantificó la carga amiloidea (% de área cubierta por material inmunorreactivo después de la tinción con anticuerpos anti-A β 3D6 o 21F12) en la corteza cerebral cubriendo inmediatamente el hipocampo incluyendo las áreas de la corteza cerebral cingulada y parietal de los cerebros de los animales de 24 meses tratados con anticuerpo 266 de ratón durante siete semanas, tal como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la tabla a continuación. Las diferencias entre los grupos de tratamiento no son estadísticamente significativas.

Tabla 2. Carga de placa amiloidea en ratones APP^{V717F+/-} después del tratamiento con anticuerpo anti-A β 266 de ratón

	N	Carga de placa (%)			
		Utilizando 3D6		Utilizando 21F12	
		Media	Error estándar	Media	Error estándar
Control (PBS)	7	44,3	5,93	0,77	0,14
Anticuerpo 266	8	38,0	2,96	0,93	0,11

Para estos animales muy viejos, el tratamiento con anticuerpo 266 de ratón no produjo una carga amiloidea significativamente diferente comparada con el grupo tratado con PBS, medido utilizando bien 3D6 o utilizando 21F12. Además, la carga de A β fue sustancialmente mayor y aumentó significativamente en comparación con la carga amiloidea en los animales más jóvenes (véase a continuación) que no pudieron discriminar un objeto nuevo de otro familiar en la tarea de reconocimiento de objetos. Más sorprendentemente, estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-A β pueden invertir las deficiencias cognitivas sin necesidad de reducir la carga amiloidea en sí misma.

Después de 7 semanas de tratamiento, el índice de reconocimiento del grupo tratado con m266 no fue significativamente diferente del que sería de esperar de una cohorte salvaje de ratones de 24 meses. Esto indica una inversión completa de la disminución cognitiva en estos animales transgénicos.

Ejemplo 12

Efecto de la administración de anticuerpo 266 en la cognición en ratones PDAPP hemicigotos, transgénicos jóvenes

Se usaron cincuenta y cuatro (54) ratones (APP^{V717F}) homocigotos, transgénicos. Veintitrés (23) ratones tenían aproximadamente dos meses al principio del estudio. Los ratones restantes tenían aproximadamente cuatro meses al principio del estudio. La duración del tratamiento fue de cinco meses. De este modo, al final de estudio, los ratones tenían aproximadamente siete (7) meses o aproximadamente nueve (9) meses.

Todas las inyecciones fueron intraperitoneales (i.p.). Cada ratón en los grupos de control con "PBS" recibió una inyección a la semana de solución salina tamponada con fosfato (PBS; 200 µl). Cada ratón de los grupos de control con "IgG" recibió una inyección a la semana de isotipo de control IgG¹ (100 µg/ratón/semana). Cada ratón de los grupos de "dosis altas" recibió una inyección a la semana de 500 microgramos de anticuerpo 266 disuelto en PBS ("HD"). Cada ratón del grupo de "dosis bajas" recibió una inyección a la semana de 100 microgramos de anticuerpo 266 disuelto en PBS ("LD"). Tres días después de la última inyección, se evaluó el comportamiento de los animales utilizando una tarea de reconocimiento de objetos, como se describió en el Ejemplo 10 anteriormente, y se calculó el índice de discriminación como diferencia entre el tiempo transcurrido en un nuevo objeto y el tiempo transcurrido en un objeto familiar. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3. Los datos están agrupados por edad de los ratones al final del estudio.

Tabla 3. Estadísticas descriptivas del índice de discriminación

		Índice de discriminación (minutos)		
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
De 7 meses				
PBS	7	2,12	4,22	1,59
IgG	8	0,81	3,64	1,29
HD	8	10,04*	6,52	2,30
De 9 meses				
PBS	7	1,87	3,54	1,34
IgG	8	0,96	3,51	1,24
LD	8	10,75*	6,44	2,28
HD	8	12,06***	7,82	2,76

*p<0,05

***p<0,0001

Considerados en conjunto, estos datos apoyan la conclusión de que la administración de anticuerpo 266, anticuerpo dirigido contra el dominio central de Aβ, atenúa la deposición de la placa en ratones APP^{V717F} transgénicos de 7-9 meses, así como invierte las alteraciones de comportamiento caracterizadas anteriormente. El tratamiento de pacientes con un anticuerpo dirigido contra el dominio central del péptido Aβ inhibirá o evitará la disminución cognitiva relacionada normalmente con la evolución de la enfermedad y la invertirá.

El índice de discriminación para los animales tratados no fue significativamente diferente del que sería de esperar en ratones de tipo silvestre de la misma edad. De este modo, solo en los animales más viejos (Ejemplo 11), el tratamiento con m266 invirtió completamente la disminución cognitiva en estos animales transgénicos más jóvenes.

Ejemplo 13

Síntesis de anticuerpo 266 humanizado

Células y anticuerpos. Se obtuvo la línea celular Sp2/0 de mieloma de ratón en ATCC (Manassas, VA) y se mantuvo en medio DME conteniendo FBS al 10 % (n.º de cat. SH32661.03, HyClone, Logan, UT) en un incubador con CO₂ a 37 °C. Se cultivaron en primer lugar células de hibridoma 266 de ratón en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10 % (HyClone), HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, 25 µg/ml de gentamicina y a continuación se expandió en medio exento de suero (Hibridoma SFM, n.º de cat. 12045-076, Life Technologies, Rockville, MD) que contenía un 2 % bajo en Ig FBS (n.º de cat. 30151.03, HyClone) hasta un volumen de 2,5 litros en botellas para rodillo. Se purificó el anticuerpo 266 (Mu266) monoclonal de ratón en el cultivo sobrenadante por cromatografía de afinidad utilizando una columna Sepharose con proteína G. Se preparó Mu266 biotinilado utilizando EZ-Link Sulfa-NHS-LC-LC-Biotina (n.º de cat. 21338ZZ, Pierce, Rockford, IL).

Clonación de los ADNc con región variable. Se extrajo ARN total de aproximadamente 10⁷ células de hibridoma utilizando reactivo TRIzol (Life Technologies) y se aisló poli(A)+ARN con el sistema de aislamiento de ARNm

PolyAtract (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del proveedor. Se sintetizó ADNc de doble cadena utilizando el kit de amplificación de ADNc SMART™ RACE (Clontech, Palo Alto, CA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los ADNc con región variable para las cadenas ligeras y las pesadas se amplificaron por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores 3' que hibridan respectivamente a las regiones constantes de las cadenas kappa y gamma de ratón y al cebador 5' universal proporcionado en el kit de amplificación de ADNc SMART™ RACE. Para la PCR de VL, el cebador 3' tiene la secuencia:

5'-TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3'
[SEQ ID NO:13]

hibridándose los restos 17-46 a la región Ck de ratón. Para la PCR de VH, los cebadores 3' presentan las secuencias degeneradas:

A G T

5' -TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTTGGC- 3'

T

[SEQ ID NO:14]

con los restos 17-50 que hibridan la cadena CH1 gamma de ratón. Se subclonaron los ADNc de VL y VH en el vector pCR4Truncado-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la determinación de la secuencia. Se realizó la secuenciación del ADN mediante reacciones de secuenciación en ciclo de PCR con terminaciones fluorescentes de cadena didesoxi (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Se analizaron las reacciones de secuenciación en un secuenciador de ADN modelo 377 (Applied Biosystems).

Construcción de regiones variables de 266 humanizados (Hu266). Se realizó la humanización de las regiones V del anticuerpo de ratón tal como indica Queen y col. [Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:10029-10033 (1988)]. Se seleccionó la región marco V humana usada como aceptor para las CDR de Mu266 basándose en la homología de secuencia. Se utilizaron los programas de ordenador ABMOD y ENCAD [Levitt, M., J. Mol. Biol. 168:595-620 (1983)] para construir un modelo molecular de las regiones variables. Se sustituyeron los aminoácidos en las regiones V humanizadas que se preveía que se habían puesto en contacto con las CDR por los correspondientes restos de Mu266. Esto se realizó en los restos 46, 47, 49 y 98 en la cadena pesada y en el resto 51 en la cadena ligera. Se cambiaron los aminoácidos en la región V humanizada que se observó que eran raros en el mismo subgrupo de la región V por los aminoácidos consenso para eliminar la inmunogenicidad potencial. Esto se realizó en los restos 42 y 44 en la cadena ligera.

Se construyeron y amplificaron los genes de la región variable de la cadena ligera y pesada utilizando ocho oligonucleótidos sintéticos solapantes ordenados en longitud desde aproximadamente 65 a 80 bases [He, X.Y., y col., J. Immunol. 160:029-1035 (1998)]. Se hibridaron los oligonucleótidos por parejas y se extendieron con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, dando cuatro fragmentos de doble cadena. Se desnaturalizaron los fragmentos resultantes, se hibridaron por parejas y se extendieron con Klenow, dando dos fragmentos. Se desnaturalizaron estos fragmentos, se hibridaron por parejas y se extendieron una vez más, dando un gen de longitud completa. Se amplificó el producto resultante por PCR utilizando el sistema PCR Expand High Fidelity (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Se purificaron en gel los fragmentos ampliados por PCR y se clonaron en el vector pCR4Truncado-TOPO. Después de la confirmación de la secuencia, se digirieron los genes VL y VH con MXIul y XbaI, se purificaron con gel y se subclonaron respectivamente en vectores para expresión de las cadenas ligera y pesada para preparar pVk-Hu266 y pVg1-Hu266 (véase las Figuras 6 y 7, respectivamente, en la presente memoria) [Co, M.S., y col., J. Immunol. 148:1149-1154 (1992)]. El anticuerpo 266 maduro humanizado expresado en estos plásmidos tiene la cadena ligera de la SEQ ID NO: 11 y la cadena pesada de la SEQ ID NO: 12.

Transfección estable. Se realizó la transfección estable en la línea celular Sp2/0 del mieloma de ratón por electroporación usando un aparato Gene Pulser (BioRad, Hércules, CA) a 360 V y 25 µF como se describe (Co y col., 1992). Antes de la transfección, se linealizaron los ADN de los plásmidos pVk-Hu266 y pVg1-Hu266 utilizando FspI. Se transfectaron aproximadamente 10⁷ células Sp2/0 con 20 µg de pVk-Hu266 y 40 µg de pVg1-Hu266. Las células transfectadas se suspendieron en medio DME que contiene FBS al 10 % y se colocaron en varias placas de 96 pocillos. Después de 48 h, se aplicó el medio de selección (medio DME que contiene FBS al 10 %, suplemento del medio HT, 0,3 mg/ml de xantina y 1 µg/ml de ácido micofenólico). Aproximadamente 10 días después del inicio de la selección, se ensayaron los sobrenadantes del cultivo para la producción de anticuerpos por ELISA como se muestra a continuación. Se expandieron los clones con alto rendimiento en medio DME que contiene FBS al 10 % y se analizó la expresión del anticuerpo posteriormente. Se adaptaron a continuación los clones seleccionados al cultivo en hibridoma SFM.

Medición de la expresión del anticuerpo por ELISA. Se recubrieron los pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos (placa Nunc-Immuno, N.º de cat. 439454, NalgeNunc, Naperville, IL) con 100 µl de 1 µg/ml de IgG anti-humana de cabra, fragmento específico de Fey, anticuerpos policlonales (N.º de cat. 109-005-098, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) en tampón de carbonato-bicarbonato sódico (pH 9,4) toda la noche a 4 °C. Después de lavar con tampón de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,1 %), se bloquearon los pocillos con 400 µl de tampón de bloqueo Superblock (N.º de cat. 37535, Pierce) durante 30 min y a continuación se lavó con tampón de lavado. Las

muestras que contenían Hu266 se diluyeron apropiadamente en tampón ELISA (PBS que contiene 1 % de BSA y 0,1 % de Tween 20), y se aplicaron a placas ELISA (100 µl por pocillo). Como patrón, se utilizó anticuerpo HuM195 monoclonal de IgG1 anti-CD33 humanizado (Co, y col., 1992, anteriormente). Se incubó la placa ELISA durante 2 h a temperatura ambiente y se lavaron los pocillos con tampón de lavado. Después se aplicaron a cada pocillo 100 µl de anticuerpos policlonales kappa anti-humanos de cabra conjugados con HRP diluidos 1/1.000 (N.º de cat. 1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) en tampón ELISA. Después de incubación durante 1 h a temperatura ambiente y lavado con tampón de lavado, se añadió a cada pocillo 100 µl de sustrato ABTS (n.º de cat. 507602 y n.º 506502, Kirkegaard y Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se interrumpió el desarrollo de color añadiendo 100 µl de ácido oxálico al 2 % por pocillo. Se leyó la absorbancia a 415 nm utilizando un lector de microplacas OPTImax (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Purificación de Hu266. Se adaptó al crecimiento en hibridoma SFM uno de los transfectantes estables Sp2/0 (clon 1D9) que expresan mucho Hu266 y se expandió hasta 2 litros en botellas giratorias. Se recogió el sobrenadante del cultivo gastado cuando la viabilidad de las células alcanzó el 10 % o por debajo y se cargó en una columna Sepharose con proteína A. Se lavó la columna con PBS antes de diluir el anticuerpo con glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5) y NaCl 0,1 M. Se dializó la proteína eluida frente a 3 cambios de 2 litros de PBS y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm antes del almacenamiento a 4 °C. Se determinó la concentración de anticuerpo midiendo la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml = 1,4 A₂₈₀). Se realizó la SDS-PAGE en tampón Tris-glicina según los procedimientos normalizados en un gel con gradiente 4-20 % (n.º de cat. EC6025, Novex, San Diego, CA). Se redujo el anticuerpo 266 humanizado purificado y se pasó en gel de SDS-PAGE. El anticuerpo completo presenta dos bandas de pesos moleculares aproximados de 25 kDa y 50 kDa. Estos resultados son acordes con los pesos moleculares de la cadena ligera y de la cadena pesada o del fragmento de la cadena pesada calculado a partir de sus composiciones de aminoácidos.

Ejemplo 14

Propiedades de la unión *in vitro* del anticuerpo 266 humanizado

Se comparó la eficacia de la unión del anticuerpo 266 humanizado, sintetizado y purificado como se describió anteriormente, con el anticuerpo 266 de ratón utilizando anticuerpo 266 de ratón biotinilado en un ELISA comparativo. Se recubrieron pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos (placa Nunc-Immuno, n.º de cat. 439454, NalgeNunc) con 100 µl de péptido β-amiloideo (1-42) conjugado con BSA en tampón de carbonato/bicarbonato sódico 0,2 M (pH 9,4) (10 µg/ml) toda la noche a 4 °C. Se preparó el conjugado Aβ₁₋₄₂-BSA disolviendo 7,5 mg de Aβ₁₋₄₂-Cys₄₃ (Aβ₁₋₄₂ con cisteína C-terminal AnaSpec) en 500 µl de dimetilsulfóxido e inmediatamente a continuación añadiendo 1.500 µl de agua destilada. Se disolvió dos (2) miligramos de albumina de suero bovino activada con maleimida (Pierce) en 200 µl de agua destilada. Se combinaron las dos soluciones, se mezclaron intensamente y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante dos (2) horas. Se utilizó una cromatografía en columna de gel para separar el péptido sin reaccionar del conjugado Aβ₁₋₄₂-Cys-BSA.

Después de lavar los pocillos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween 20 al 0,1 % (tampón de lavado) usando un lavador de placas ELISA, se bloquearon los pocillos añadiendo 300 µl de reactivo SuperBlock (Pierce) por pocillo. Después de 30 minutos de bloqueo, se lavaron los pocillos con tampón de lavado y se retiró el líquido en exceso.

Se añadió por triplicado una mezcla de Mu266 biotinilado (0,3 µg/ml de concentración final) y anticuerpo competidor (Mu266 o Hu266; comenzando por la concentración final de 750 µg/ml y diluciones en serie 3 veces) en tampón ELISA en un volumen final de 100 µl por pocillo. Como control sin competidor, se añadieron 100 µl de 0,3 µg/ml de Mu266 biotinilado. Como control de fondo, se añadieron 100 µl de tampón ELISA. La placa ELISA se incubó a temperatura ambiente durante 90 min. Después de lavar los pocillos con tampón de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 µl de estreptavidina 1 µg/ml conjugada con HRP (n.º de cat 21124, Pierce). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 min y se lavó con tampón de lavado. Para el desarrollo de color, se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato de ABTS peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories). Se interrumpió el desarrollo de color añadiendo 100 µl/pocillo de ácido oxálico al 2 %. Se leyó la absorbancia a 415 nm. Se representaron las absorbancias frente a log de la concentración del competidor, se ajustaron las curvas a los puntos de datos (utilizando Prism) y se determinó la CI50 para cada anticuerpo utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

La CI50 media para 266 de ratón fue 4,7 µg/ml (tres experimentos independientes, desviación estándar = 1,3 µg/ml) y para 266 humanizado fue 7,5 µg/ml (tres experimentos independientes, desviación estándar = 1,1 µg/ml). Se realizó un segundo conjunto de tres experimentos, esencialmente como se describió anteriormente y se determinó la CI50 media para 266 de ratón que fue de 3,87 µg/ml (SD=0,12 µg/ml) y para 266 humano, se determinó la CI50 que fue 4,0 µg/ml (SD=0,5 µg/ml). Basándose en estos resultados, los presentes inventores concluyen que el 266 humanizado presenta propiedades de unión que son muy similares a las del anticuerpo 266 de ratón. Por consiguiente, es de esperar que el 266 humanizado presente actividades *in vitro* y *in vivo* muy similares comparadas con el 266 de ratón y presenten en humanos los mismos efectos demostrados con el 266 de ratón en ratones.

Ejemplo 15Propiedades de unión *in vitro* de anticuerpos 266 y 4G8 de ratón

Se determinó la afinidad del anticuerpo ($KD = Kd/Ka$) usando un biosensor 2000 de BIAcore y se analizaron los datos con el programa informático BIAevaluation (v. 3.1). Se acopló un anticuerpo de captura (anticuerpo de conejo) mediante grupos amina libres a grupos carbonilo en la celda de flujo 2 de un chip del biodetector (CM5) utilizando N-etil-N-dimetilaminopropil carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS). Se acopló IgG de conejo no específica a la celda de flujo 1 como control de fondo. Se capturaron anticuerpos monoclonales para dar 300 unidades de resonancia (UR). Se circuló a continuación amiloide-beta 1-40 o 1-42 (Biosource International, Inc.) sobre el chip y concentraciones decrecientes (1000 a 0,1 veces KD). Para regenerar el chip, se eluyó anticuerpo anti-A β ligado desde el chip utilizando un lavado con glicina-HCl (pH 2). Una inyección de control no conteniendo amiloide-beta sirvió como control para la sustracción de control. Se analizaron los sensorgramas que demuestran las fases de asociación y disociación para determinar Kd y Ka. Utilizando este procedimiento, se observó que la afinidad del anticuerpo 266 de ratón tanto para A β ₁₋₄₀ como para A β ₁₋₄₂ era de 4 pM. La afinidad de 4G8 para A β ₁₋₄₀ fue de 23 nM y para A β ₁₋₄₂ fue de 24 nM. A pesar de la diferencia de 6000 veces en las afinidades para A β , tanto 266 como 4G8, que se une a los epítomos entre los aminoácidos 13 y 28 de A β , secuestran de manera eficaz A β en el FCE humano. Por consiguiente, la situación del epítomo es primordial, en lugar de la afinidad de unión, para determinar la capacidad de un anticuerpo para secuestrar A β y para proporcionar las ventajas beneficiosas y sorprendentes de la presente invención.

Ejemplo 16Mapeo del epítomo del anticuerpo 266 de ratón utilizando la metodología Biacore y péptidos solubles

BIAcore es un sistema biodetector automatizado para medir las interacciones moleculares [Karlsson R., y col., J. Immunol. Methods 145:229-240 (1991)]. La ventaja del BIAcore respecto a otros análisis de unión es que la unión del antígeno puede medirse sin tener que marcar o inmovilizar el antígeno (es decir, el antígeno mantiene una conformación más nativa). Se utilizó la metodología BIAcore para evaluar la unión de diversos fragmentos del péptido beta-amiloide en el anticuerpo 266 de ratón, esencialmente como se describió anteriormente en el Ejemplo 12, excepto que todas las diluciones se prepararon con solución salina tamponada con HEPES que contenía Tween 20, se inyectaron una diversidad de fragmentos Ad (BioSource International), y se inyectó una concentración única de cada fragmento (440 nM).

Los fragmentos de beta amiloide 1 a 28, 12 a 28, 17 a 28 y 16 a 25 se unieron al anticuerpo 266 de ratón, mientras que los fragmentos de A β 1-20, 10-20 y 22-35 no se unieron. Los fragmentos 1-20, 10-20 y 22-35 se unieron a otros Mab con especificidad de epítomo conocida para estas regiones de A β . Usando esta metodología, el epítomo de unión para el anticuerpo 266 de ratón parece estar entre los aminoácidos 17 y 25 de A β . Dado que la unión tiene lugar normalmente con al menos 3 restos del presente epítomo, podría deducirse además que el epítomo está contenido en los residuos 19-23.

Ejemplo 17Propiedades de la unión *in vitro* de anticuerpo 266 humanizado

Se determinó esencialmente tal como se describió anteriormente en el Ejemplo 15 la afinidad ($KD = Kd/Ka$) del anticuerpo 266 humanizado, sintetizado y purificado como se describió anteriormente. Usando este procedimiento, se observó que la afinidad del 266 humanizado para A β ₁₋₄₂ era de 4 pM.

40

ES 2 611 427 T3

```

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Leu Val
      35                40                45
Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val
      50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Xaa Asn Thr Leu Tyr
      65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
      100                105                110

```

(SEQ ID NO:8);

en la que:

- 5 Xaa en la posición 1 es Glu o Gln;
 Xaa en la posición 7 es Ser o Leu;
 Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser;
 Xaa en la posición 63 es Thr o Ser;
 Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val o Thr;
 Xaa en la posición 76 es Lys o Arg;
 10 Xaa en la posición 89 es Glu o Asp; y
 Xaa en la posición 107 es Leu o Thr.

5. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 en la que el anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera de la secuencia dada por la SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena pesada dada por la SEQ ID NO: 10.

15 6. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera de la secuencia dada por la SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada de la secuencia dada por la SEQ ID NO: 12.

20 7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a un epítipo contenido dentro de las posiciones 13-28 del A β para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica, en la que el anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena ligera que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

cadena ligera CDR1:

```

1                5                10                15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

```

(SEQ ID NO:1);

25 o

```

1                5                10                15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

```

(SEQ ID NO:15);

cadena ligera CDR2:

```

1                5
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (SEQ ID NO:2);

```

y cadena ligera CDR3:

ES 2 611 427 T3

1 5
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr (SEQ ID NO:3)

y una secuencia marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina humana; y
b) una cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

5 una cadena pesada CDR1:

1 5
Arg Tyr Ser Met Ser (SEQ ID NO:4)

cadena pesada CDR2:

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
Gly
(SEQ ID NO:5);

o

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
Gly
(SEQ ID NO:16);

10

y cadena pesada CDR3:

1
Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6)

y una secuencia marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina humana.

15 8. Uso de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a un epítipo contenido dentro de las posiciones 13-28 del A β para la fabricación de un medicamento para la prevención, tratamiento o la reversión de la disminución cognitiva en la enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica, en la que el anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena ligera que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

20 cadena ligera CDR1:

1 5 10 15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
(SEQ ID NO:1);

o

1 5 10 15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
(SEQ ID NO:15);

cadena ligera CDR2:

1 5
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (SEQ ID NO:2);

25

y cadena ligera CDR3:

ES 2 611 427 T3

```

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa Tyr Ser
          20          25          30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
          85          90          95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys
          100          105          110
Arg (SEQ ID NO:7)

```

en la que:

- 5 Xaa en la posición 2 es Val o Ile;
- Xaa en la posición 7 es Ser o Thr;
- Xaa en la posición 14 es Thr o Ser;
- Xaa en la posición 15 es Leu o Pro;
- Xaa en la posición 30 es Ile o Val;
- Xaa en la posición 50 es Arg, Gln o Lys;
- 10 Xaa en la posición 88 es Val o Leu;
- Xaa en la posición 105 es Gln o Gly;
- Xaa en la posición 108 es Lys o Arg; y
- Xaa en la posición 109 es Val o Leu.

y una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia:

```

Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa 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 Arg Tyr
          20          25          30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Leu Val
          35          40          45

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val
          50          55          60

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
          100          105          110

```

15 (SEQ ID NO:8);

en la que:

- 20 Xaa en la posición 1 es Glu o Gln;
- Xaa en la posición 7 es Ser o Leu;
- Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser;
- Xaa en la posición 63 es Thr o Ser;
- Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val o Thr;
- Xaa en la posición 76 es Lys o Arg;
- Xaa en la posición 89 es Glu o Asp; y
- Xaa en la posición 107 es Leu o Thr.

11. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el anticuerpo tiene una región variable de la cadena ligera de la secuencia dada por la SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena pesada dada por la SEQ ID NO: 10.
- 5 12. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera de la secuencia dada por la SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada de la secuencia dada por la SEQ ID NO: 12.
13. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende una región variable de la cadena ligera de la secuencia dada por la SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena pesada dada por la SEQ ID NO: 10 para su uso en terapia.
- 10 14. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende una cadena ligera de la secuencia dada por la SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada dada por la SEQ ID NO: 12.
- 15 15. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14 para su uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica.
16. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14 para su uso en la prevención, tratamiento o la reversión de la disminución cognitiva en un sujeto diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica.

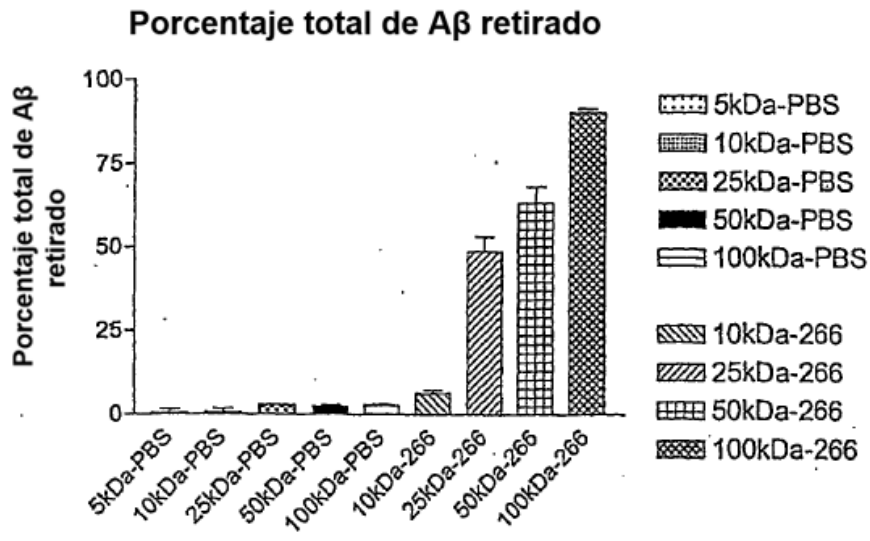


Figura 1

Concentración de $A\beta$ en el plasma después de la
inyección intravenosa de 266 en ratones APP^{V717F}

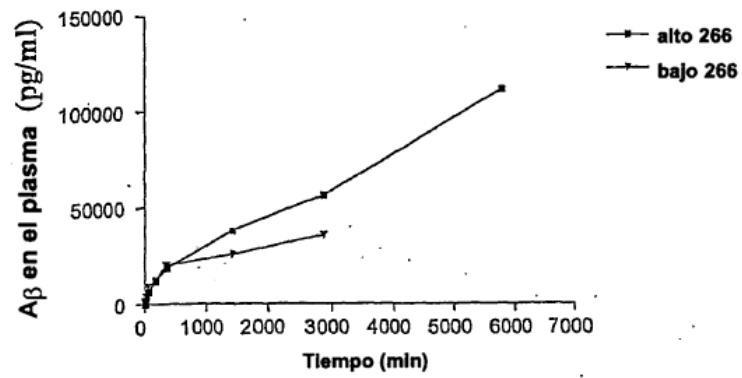


Figura 2

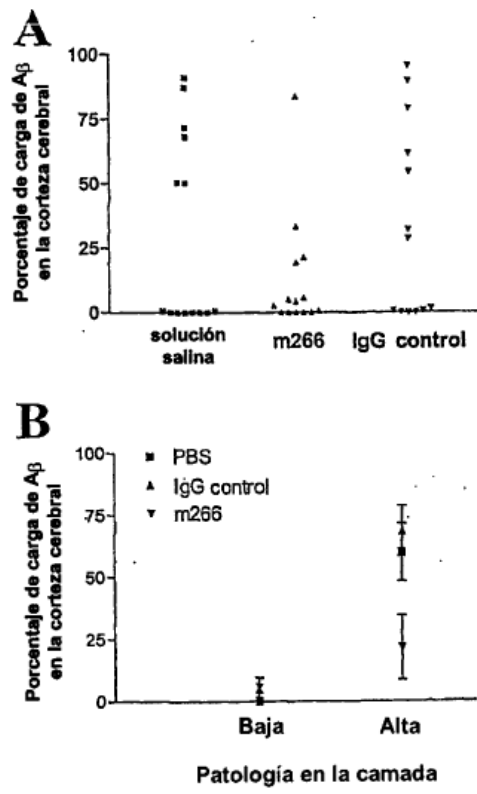


Figura 3

Figura 4. Secuencias de polinucleótidos de pVk-Hu266 para expresar la cadena ligera de 266 humanizado y códigos de un solo aminoácido para la cadena ligera de 266 humanizada expresada

619 ACGCGTCCACCATGAAGTGCCTGTTAGGCTGTTGGTCTGATGTTCTGGATTCTCGCTTCCAGGTGTGATGTTGTGATG
M K L P V R L L V L M F W I P A S R C D V V M

699 ACCGAGAGCCCACTCTCCCTGCTGTCACCOCTTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTTCAGATCTAGTTCAGAGCCTTATRYA
T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L I Y

779 TAGTGTGGAAACGCCTATTTACATGGTCTTTCGAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCA
S D G N A Y L H W F L Q K P G Q S P R L L I Y K V S N

859 ACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG
R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E

939 GCGGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGTTCTCAAAGTACACATGTTCCGTTGGACGTTCCGTTCAAGSCACCAGGTTGGAAAT
A E D V G V Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I

1019 CAAAGTGTAGTAGAATTTAATCTAGAAATTTCTAAACTCTGAGGGGGTCCGATGACGTTGGCCATTTCTTTCCCTAAAGCATT
K R

1099 GAGTTTACTGCAAGGTTCAGAAAAGCATTGCAAAAGCCCTCAGAAATGGCTGCAAGAGCTCCAAACAAAACAATTTAGAACTTT

1179 ATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATAAGCTTCTTGGTCTCCTTGTCTATAAT

1259 ATCTGGGATAAGCATGCTGTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATATCCGCAACACACACCCAGGGCAGAA

1339 CTTTGTACTTAAACACCATCTCTGTTTCTGTTCTTCTCCTCAGGAACTGTGGCTCCACCCTCTGTCTTCTCATCTTCCCGCCAT
T V A A P S V F I F P P S

1419 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
D E Q L K S G T A S V V C L L N F Y P R E A K V Q W

1499 TGGAGGTGGATAAGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCCAAGAGTGTTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACTCAGC
K V D N A L Q S G N S Q S S V T S Q D S K D S T Y S L

1579 CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCC
S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L

1659 TGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTGCCTCCACCTGCTCCTCAGTTCACGC
S S P V T K S F N R G E C *

1739 CTGACCCCTCCCATCTCTTGGCCCTCGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTT
1819 CACCTCACCCCCCTCCTCTCTGCTTAAATTAATGCTAATGTTGGAGGAGAAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCAC
1899 CTGTGGTTTCTCTCTTCTCCTCATTTAATAATTAATTAATCTGTTGTTTTACCACTACTCAATTTCTCTTATAAGGGACTAA
1979 ATATGTAGTCACTCAAGGCGCATACCATTATAAAAATCATCCTTCTATTCTATTTACCCATCATCTCTGCAAGRC
2059 AGTCTCTCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCAGCTCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCCTTCTGTTTTC
2139 CCTCCTCAGCAAGCCCTCATAGTCTTTTTAAGGGGTGACAGGCTTACAGTCAATATCTCTTGAATCAATCCCTGAGA
2219 ATCAACCAAGCAAATTTTTCAAAGAGAAACCTGCTATAAAGAGAAATCATTCATTGCAACATGATATAAATAACAC
2299 ACAATAAAGCAAATTAATAAACAAACAATAGGGAAATGTTAAGTTCAATCATGGTACTTAGACTTAATGGAAATGTCATG
2379 CCTTATTTTACATTTTAAACAGGTAAGGAACTCCTGCTGCGCAAGGCCCGTATTGAGTACTTTCCACACCTAATTT
2459 AATCCACACTATACTGTGAGNTTAAAAACATTCATTAAATGTTGCAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATATATTC

2539 TATAACTCAGCAATCCCACTTCTAGGATCC

La secuencia completa del gen de la cadena ligera de Hu266 se localiza entre los sitios MluI y BamHI en pVk-Hu266. El número de nucleótido indica su posición en pVk-Hu266. Los exones V_k y C_k se traducen por un código de una sola letra; el punto indica el codón de terminación de la traducción. La cadena pesada madura comienza en el ácido aspártico (D) con subrayado doble. Las secuencias del intrón están en cursiva.

Figura 5. Secuencias de polinucleótidos de pVg1-Hu266 para expresar la cadena pesada de 266 humanizado y códigos de un solo aminoácido para la cadena pesada de 266 humanizada expresada

619 ACGCGTCCACCATGAATTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGCTGTTTAAAGGTGCTCCTGTGGAAGTGCAGCTG
M N F G L S L I F L V L V L K G V L C E V Q L

699 GTGGAGTCTGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAG
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 R

779 GTATTCCATGTCTTGGGTCGCCAGGTCAGGCAAGGGCCTGGAATGGTGCACAAATTAATAGTGTGGTAATAGCA
Y S M S W V R Q A P G K G L E L V A Q I N S V G N S

859 CCTACTATCCAGACACTGTAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCCTGTACCTGCAAATGAAC
T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N

939 TCCTGTAGGGCCGAAGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAGCGGAGACTACTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACAGTCTC
S L R A E D T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T L V T V S

1019 CTCAGGTGAGTCTCACAACCTCTAGAGCTTCTGGGGCAGGCCAGGCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGCTA
S

1099 AGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTCCACA CCCAATGCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGGGCAGCT
1179 TAAGAACCAGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCACACCGCGGTACATGGCACCACTCTCTTGACGCT
A

1259 CCACCAAGGGCCCATCGTCTTCCCTGGCACCTCTCCAAAGACACTCTGGGGGCACAGCGCCCTGCGCTG
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L

1339 GTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGC
V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A

1419 TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA
V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y

1499 TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCA CAGGGAGGGAGGGT
I C N V N H K P S N T K V D K K V

1579 TCTGTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGA CGCATCCCGCTATGCGACCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCC
1659 CCGTCTGCTCTTCA CCGGAGGCTCTGCCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCGAGGCT
1739 CTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAG
1819 CCAATATCCGGGAGGACCTGCCCCCTGA CCAAGCCCA CCGCAAGGCCAAACTCTCCA CTTCCCTCAGACCTCGGACACCTTC
1899 TCTCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAAGGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG
E P K S C D K T H T C P P

1979 TGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCTCGCCCTCCAGCTCAAGCGGGA CAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACA
C P

2059 GGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCACTTCTCCT
A P E L L G G P S V F L

2139 TTCCCCCAAACCCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGA
F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E

2219 AGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGÀCAAAGCCGCGGAGGAGCAGT
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q

2299 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGACACAGGACTGGCTGAAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAG
Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K

2379 GTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGAGGGCC
V S N K A L P A P I E K T I S K A K

2459 ACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCTCTGCCCTGAGAGTGA CCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCC
G Q P

2539 CGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTCAA
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K

2619 AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCG

ES 2 611 427 T3

G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P

2699 TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTC
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F

2779 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACCGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGTGG
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *

2859 ACGGCCGCAAGCCCCGCTCCCCGGCTCTCGGGTGGCAGGAGTGCCTGGCACGTACCCCTGTACNTACTTCCC
2939 GCGGCCAGCATGGAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCTGCGAGACTGTGATGGTCTTCCACGGGTGAGGC
3019 CGAGTCTGAGGCCTGAGTGGATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCACACTGGCCACGGCTGTGCAAGTGTGC
3099 CTGGCCCGCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGGAGGGTGGGGATTTCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGC
3179 AGCACCTGCCCTGGGCTGGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACAGCCCTGCCCTGTAGGAGAC
3259 TGTCTGTCTGTGAGCGCCCTGTCTCCGACCTCCATGCCCACTGGGGGCATGCTAGTCCATGTGGTAGGGACAGG
3339 CCTCCCTCACCCATCTACCCCAAGGCACTAACCCCTGGCTGCCCTGCCAGCCTCGCACCCGATGGGGACACAACCG
3419 ACTCCGGGACATGCACCTCGGGCCCTGTGAGGGACTGGTCAGATGCCACACACACTCAGCCAGACCCGTTCA
3499 ACAAAACCCGCACTGAGGTTGGCCGGCCACAGGCCACACACACACAGTGCACGCTCACACAGGAGCCTCACCCGG
3579 GCGAACTGCACAGCACCCAGACCAGCAAGTCTCCGACACGTGAACACTCCTGGACACAGGCCCCAGCAGCCCA
3659 CGCGGCACTCAAGGCCCAAGGCTCTCGGCAGCTTCTCCACATGTGACTGCTCAGACAAACCCAGCCCTCTCTCA
3739 CAAGGGTCCCTGCAGCCGCCACACACACAGGGATCACACACAGTCACTGCTCCCTGGCCCACTTCCAG
3819 TGCCGCCCTTCCCTGCAGGATCC

La secuencia completa del gen de la cadena pesada de Hu266 se localiza entre los sitios MluI y BamHI en pVg1-Hu266. El número de nucleótido indica su posición en pVg1-Hu266. Los exones V_H y C_H se traducen por un código de una sola letra. El punto indica el codón de terminación de la traducción. La cadena pesada madura comienza en el ácido glutámico (E) con subrayado doble. Las secuencias del intrón están en cursiva.

Figura 6. Plásmido pVkJu266

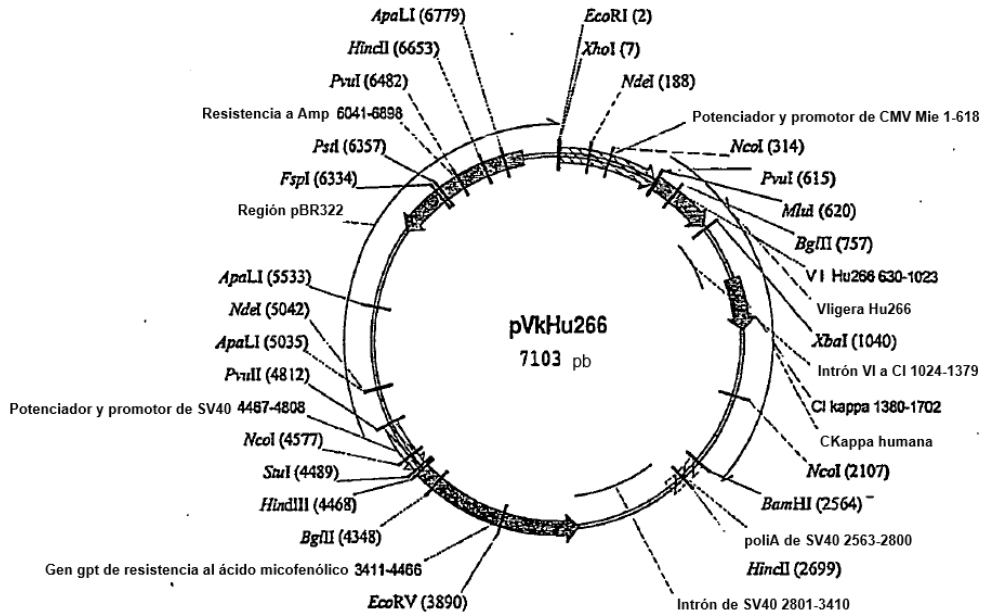


Figura 7. Plásmido pVg1-Hu266

