

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 949**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2010 PCT/JP2010/004926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011 WO11016239**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2010 E 10806239 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2462162**

54 Título: **Anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros beta A y uso de los mismos**

30 Prioridad:

06.08.2009 US 231797 P
26.02.2010 US 282550 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2017

73 Titular/es:

IMMUNAS PHARMA, INC. (100.0%)
Kanagawa Science Park R&D D11F 3-2-1 Sakado
Takatsu-ku
Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012, JP

72 Inventor/es:

YKOKSEKI, TATSUKI;
OKAMOTO, YASUHIDE;
UMEDA, MAKOTO;
TAKAMATSU, NAOFUMI;
ITO, TOSHIYUKI;
IMAI, YUKIHO y
FUJII, SHINOBU

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 614 949 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 que se unen específicamente a oligómeros beta A y uso de los mismos

Campo técnico

Prioridad

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional Estadounidense No. 61/231,797, presentada el 6 de agosto de 2009, y la Solicitud Provisional Estadounidense No. 61/282,550, presentada el 26 de febrero de 2010, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia.

Campo técnico

10 La presente invención se relaciona con el uso de anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros beta A en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.

Técnica antecedente

15 El número de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD) fue de más de aproximadamente 26 millones en todo el mundo en el 2006, y se prevé que continúe aumentando en una sociedad que envejece (Literatura de no Patente (NPL) 1). Sin embargo, no existe ningún agente terapéutico curativo que detenga o revierta la progresión de la enfermedad de Alzheimer, aunque los agentes terapéuticos que retardan la progresión de la enfermedad están disponibles comercialmente.

20 Diversa evidencia ha mostrado que el deterioro de la memoria surge de la disfunción sináptica activada por los oligómeros beta amiloide solubles (beta A) (véase Literatura de No Patente 2 y 3). La acumulación excesiva y el depósito de oligómeros beta A puede ser lo que desencadena una serie de cascadas patológicas que llevan a la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, la intervención terapéutica dirigida a oligómeros beta A puede ser efectiva para bloquear estas cascadas (véase la Literatura de no Patente 4 y 5).

25 Recientemente, se están desarrollando productos farmacéuticos de anticuerpos que se dirigen a beta A. Sin embargo, los anticuerpos de oligómero beta anti-A previamente reportados no se unen específicamente a oligómeros beta A, sino que se unen a todas las tres formas, es decir, monómeros beta A, oligómeros y fibrillas. Por lo tanto, incluso si se administran in vivo, se cree considera que la cantidad de anticuerpos que se unen a oligómeros beta sería relativamente baja, y puede ser necesario aumentar la dosificación para obtener efecto. Más aún, dado que los monómeros beta A están presentes en el cerebro de individuos sanos, se pueden provocar efectos secundarios por la unión de los anticuerpos a los monómeros beta A.

30 Adicionalmente, la cantidad de oligómero beta A podría ser un índice de la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, es difícil medir los oligómeros beta A solo utilizando anticuerpos beta anti-A convencionales.

35 Se muestra adelante la información de la técnica anterior relacionada con la presente invención. En particular, el documento WO 03/104437 divulga anticuerpos que se unen a ligandos difusibles derivados de amiloide beta (ADDLs) y su uso en modular la formación y/o actividad de ADDL. El documento WO 2006/055178 divulga anticuerpos que reconocen diferencialmente conformaciones multidimensionales de los ADDL para detectar los ADDL y diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. El documento WO 2009/051220 describe anticuerpos monoclonales que son específicos a oligómeros beta amiloides solamente solubles, pero no reconocen monómeros beta amiloides solubles que son útiles como anticuerpos monoclonales de diagnóstico/terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer. Moretto et al. (2007) divulgan anticuerpos sensibles a la conformación contra el beta amiloide de Alzheimer mediante la inmunización con un péptido de epítipo de células B restringido a tiorredoxina. Lambert et al. (2007) divulgan anticuerpos monoclonales que se dirigen a los ensamblajes patológicos de beta amiloide.

Lista de citas

Literatura de No Patente

NPL 1: Brookmeyer R et al., *Alzheimers Dement.* Jul; 3(3):186-91, 2007

45 NPL 2: Klein WL, *Trends Neurosci.* 24: 219-224, 2001

NPL 3: Selkoe DJ, Science 298: 789-791, 2002

NPL 4: Haass C et al.: Nat Rev Mol Cell Biol. 8: 101-12, 2007

NPL 5: Lee EB, et al.: J. Biol. Chem. 281: 4292-4299, 2006

NPL 6: Moretto Nadia et al., J Biol. Chem. 282: 11436-11445, 2007

5 NPL 7: Lambert MP et al., J Neurochemistry, 100: 23-35

Literatura de Patente

PL 1: WO 03/104437 A2

PL 2: WO 2006/055178 A2

PL 3: WO 2009/051220 A1

10 Resumen de la invención

Problema técnico

Se logró la presente invención en vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención es proporcionar los anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros beta A, y usos de los mismos. Más específicamente, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros beta A para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer, así como también composiciones farmacéuticas para dicho uso.

Solución al Problema

Los presentes inventores produjeron con éxito diversos anticuerpos monoclonales que son específicos a oligómeros beta amiloide solamente solubles (beta A) y no reconocen monómeros beta A solubles que son moléculas fisiológicas, que utilizan un tetrámero beta A aislado como un antígeno.

Por lo tanto, los presentes inventores divulgan que los múltiples anticuerpos son candidatos prometedores para anticuerpos terapéuticos para tratar/prevenir la enfermedad de Alzheimer.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Un anticuerpo que reconoce un oligómero beta A aislado como un antígeno, en el que el anticuerpo no se une a un monómero beta A para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.

[2] El anticuerpo de [1], que es uno cualquiera de (1) o (2) adelante:

(1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106;

(2) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 108;

[3] El anticuerpo de [1], que es uno cualquiera de (1) a (4) adelante:

(1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 como CDR3;

(2) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 como CDR3;

(3) un anticuerpo que comprende una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en el anticuerpo de uno cualquiera de (1) o (2), que tiene actividad equivalente al anticuerpo de uno cualquiera de (1) o (2); y

(4) un anticuerpo que se une al epítipo unido por el anticuerpo de uno cualquiera de (1) o (2).

5 [4] El anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [3], en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

[5] Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [4].

10 [6] Una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer, que incluye sin limitación suprimir el progreso de la enfermedad de Alzheimer, que comprende el anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [4] o el fragmento de unión a antígeno de [5], y un portador farmacéuticamente aceptable.

[7] También se describe que la composición de [6], se puede utilizar como un agente contra el deterioro cognitivo, un agente para suprimir formación de placa senil, un agente para suprimir la acumulación de beta A, un agente antineurotóxico, un agente para inhibir la formación de fibrilla de amiloide beta A, o un agente contra la toxicidad sináptica.

15 [25] En el método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer que incluye, sin limitación, el método que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [4] o el fragmento de unión a antígeno de [5].

Efectos ventajosos de la invención

20 Se espera que los anticuerpos divulgados por la presente invención contribuyan al establecimiento de métodos preventivos/terapéuticos selectivos para moléculas responsables de provocar afecciones patológicas de la enfermedad de Alzheimer.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta fotografías de los resultados del análisis de transferencia dot sobre cada uno de los anticuerpos IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, y IR-148.

25 La Figura 2 presenta los resultados de ELISA de competencia sobre los seis anticuerpos. El eje vertical muestra la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm, y el eje horizontal muestra la concentración del oligómero o monómero beta A (mg/ml) utilizado como un inhibidor. Las líneas discontinuas de cada gráfico muestran la actividad de unión al antígeno cuando se utilizó el oligómero beta A como un inhibidor. Las líneas continuas de cada gráfico muestran la actividad de unión al antígeno cuando se utilizó el monómero beta A como un inhibidor.

30 La Figura 3 presenta los resultados de ELISA de competencia en los seis anticuerpos en los que se muestra la concentración del inhibidor como la concentración molar. El eje vertical muestra la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm, y el eje horizontal muestra la concentración molar del oligómero o monómero beta A (mol/L) utilizado como un inhibidor. La concentración molar (mol/L) del oligómero beta A se calculó al convertir el número molar del oligómero beta A en aquel del monómero beta A.

35 La Figura 4 muestra los resultados del análisis de la afinidad de los seis anticuerpos a oligómeros beta A mediante Biacore 3000.

La Figura 5 muestra los resultados del ensayo de neutralización contra citotoxicidad inducida por beta A utilizando cada uno de los anticuerpos.

40 La Figura 6 muestra los resultados del ensayo de inhibición de la formación de fibrillas beta A utilizando cada uno de los anticuerpos.

La Figura 7 muestra los resultados del ensayo de inmunotransferencia para evaluar si cada uno de los anticuerpos se une a la APP humana. La APP humana se detectó en el resultado de Tg2576 utilizando el anticuerpo 6E10 de control, que está marcado por la flecha.

Descripción de las realizaciones

La presente invención se describirá más específicamente adelante.

5 Como se describió anteriormente, los presentes inventores tuvieron éxito en obtener anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer. Es decir, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A. Adicionalmente, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A y proteína precursora amiloide (APP). Los anticuerpos preferiblemente de aíslan o purifican.

10 Los términos "aislado" y "purificado" utilizados para las sustancias (anticuerpos y similares) de la presente invención indican que las sustancias sustancialmente no incluyen por lo menos una otra sustancia que pueda estar contenida en la fuente natural. Por lo tanto, los "anticuerpos aislados" y "anticuerpos purificados" se refieren a anticuerpos que no incluyen sustancialmente materiales celulares, tales como hidrocarburos, lípidos, u otras proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido de la cual se derivan los anticuerpos (proteínas). Cuando los anticuerpos se sintetizan químicamente, los términos se refieren a anticuerpos que no incluyen sustancialmente sustancias precursoras químicamente u otras sustancias químicas. En una realización preferida, se aíslan o purifican los anticuerpos de la presente invención.

"Anticuerpos" se refiere a glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Los anticuerpos muestran especificidad de unión hacia antígenos específicos. Aquí, "antígenos" se refiere a proteínas que tienen la capacidad de unirse a los anticuerpos correspondientes, e inducir reacciones de antígeno-anticuerpo in vivo.

20 Aquí, la cadena pesada del anticuerpo se puede indicar como "cadena H", la cadena ligera del anticuerpo se puede denotar como "cadena L", la región variable de cadena pesada se puede denotar como "VH", la región variable de cadena ligera se puede denotar como "VL", la región constante de cadena pesada se puede denotar como "CH", la región constante de cadena ligera se puede denotar como "CL", la región de estructura se puede denotar como "FR", y la región determinante de complementariedad se puede denotar como "CDR".

25 Las proteínas beta A, que son los constituyentes principales de los amiloides, son péptidos que consisten de 40 a 42 aminoácidos, y son conocidos por ser producidos a partir de proteínas precursoras denominadas proteínas precursoras amiloides (APP) por la acción de proteasas. Además de las fibrillas de amiloides recolectadas en fracciones de sedimentos ultracentrifugados, las moléculas de amiloide producidas a partir de APP incluyen ensamblajes no fibrosos de oligómeros, adicionalmente a monómeros solubles. Los "oligómeros beta A" de la presente invención se refieren a ensamblajes no fibrosos. El grado de polimerización beta A del "oligómero beta A" de la presente invención no está particularmente limitado, sino que es normalmente de 2 a 150. Los "oligómeros beta A" de la presente invención incluyen, por ejemplo, oligómeros beta40 A (beta 1-40 A), oligómeros beta42 A (beta 1-42 A), y oligómeros beta40 A/ beta42 A (en los que se polimerizan beta40 A y beta42 A). Por ejemplo, los "oligómeros beta A" de la presente invención son, normalmente, moléculas que muestran un peso molecular de 45 a 160 kDa en SDS-PAGE, y 22.5 a 1.035 kDa en Blue Native PAGE. Utilizando tamices moleculares, las moléculas se recolectan principalmente en la solución de retención de >100 kDa. Cuando se observa bajo un microscopio de fuerza atómica, las moléculas muestran morfologías mezcladas de moléculas granulares, en forma de perla, y en forma de anillo que tiene una altura de 1.5 a 3.1 nm.

40 No existe limitación en el origen y forma de los anticuerpos utilizados en la presente invención siempre que se unan a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A, o se unan a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A y proteína precursora amiloide.

Los anticuerpos se destacan por las características que se unen a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A, o se unen a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A y proteína precursora amiloide. Preferiblemente, estos anticuerpos tienen las siguientes características.

45 En el análisis de transferencia dot, reaccionan con oligómeros beta40 A y oligómeros beta42 A, pero no con monómeros beta40 A.

En el ensayo ELISA de competición utilizando oligómeros beta A inmovilizados, la concentración de inhibición al 50% (IC50) del monómero beta A para la unión de los anticuerpos a los oligómeros beta A inmovilizados es mayor que aquella del oligómero beta A.

50 En el ensayo ELISA de competición utilizando oligómeros beta A inmovilizados, la IC50 del monómero beta A es 500 nmol/L o más, preferiblemente 1000 nmol/L o más, más preferiblemente 1500 nmol/L o más, o más preferiblemente 2000 nmol/L o más.

En el ensayo ELISA de competición utilizando oligómeros beta A inmovilizados, la IC50 del oligómero beta A es 100 nmol/L o menos, preferiblemente 50 nmol/L o menos, más preferiblemente 25 nmol/L o menos, o más preferiblemente 20 nmol/L o menos.

5 En el ensayo ELISA de competición utilizando oligómeros beta A inmovilizados, la selectividad de antígeno mostrada por IC50 de monómero beta A versus el oligómero beta A para la unión de los anticuerpos a los oligómeros beta A inmovilizados, es decir, la IC50 del monómero beta A/ IC50 del oligómero beta A, es 50 o más, preferiblemente 100 o más, más preferiblemente 150 o más, o más preferiblemente 200 o más.

10 En el análisis de afinidad para oligómeros beta A utilizando Biacore (Biacore 3000), la constante de índice de unión (ka) es 1.0E+04 M'S⁻¹ o más, preferiblemente 2.0E+04 M'S⁻¹ o más, más preferiblemente 5.0E+04 M'S⁻¹ o más, o más preferiblemente 1.0E+05 M'S⁻¹ o más.

En el análisis de afinidad para oligómeros beta A utilizando Biacore (Biacore 3000), la constante de índice de disociación (kd) es 0.5 S⁻¹ o menos, preferiblemente 0.2 S⁻¹ o menos, más preferiblemente 0.1 S⁻¹ o menos, más preferiblemente 0.05 S⁻¹ o menos, más preferiblemente 0.01 S⁻¹ o menos, o más preferiblemente 6.0E-03 S⁻¹ o menos.

15 En el análisis de afinidad para oligómeros beta A utilizando Biacore (Biacore 3000), la constante de disociación (KD) es 5.0E-06 M o menos, preferiblemente 1.0E-06 M o menos, más preferiblemente 7.0E-07 M o menos, más preferiblemente 1.0E-07 M o menos, o más preferiblemente 5.0E-08 M o menos.

En el análisis de inmunotransferencia, no reaccionan con proteína precursora amiloide humana.

20 Los anticuerpos de la presente invención se pueden destacar en por lo menos una de las características anteriores. Adicionalmente, los anticuerpos se pueden destacar en dos o más de las características anteriores.

25 Los "anticuerpos" de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales. Los anticuerpos de la presente invención también incluyen cualquier tipo de anticuerpos tales como anticuerpos de animales no humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, los minicuerpos descritos posteriormente, anticuerpos modificados por secuencia de aminoácidos, anticuerpos modificados conjugados a otras moléculas (por ejemplo, polímeros tales como polietilenglicol), y anticuerpos modificados en la cadena de azúcar.

30 Aquí, el término "anticuerpos monoclonales" se refiere a anticuerpos que se obtienen de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos. Es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos a excepción de posibles mutantes naturales que pueden estar presentes en una cantidad de trazas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y reconocen un Único sitio antigénico. Cada uno de los anticuerpos monoclonales reconoce un Único determinante del antígeno, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que contienen normalmente diferentes anticuerpos contra diferentes determinantes antigénicos (epítomos).

35 Adicionalmente a la especificidad mencionada anteriormente, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que se pueden sintetizar a partir de un cultivo de hibridoma que no está contaminado por otras inmunoglobulinas. Por lo tanto, "monoclonal" indica las características de los anticuerpos que se pueden obtener a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea. Este término no indica el requerimiento de algún método específico para la producción de anticuerpos.

40 Básicamente, los anticuerpos monoclonales se pueden producir al utilizar técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden producir por el método de hibridoma descrito primero por Kohler y Milstein (Nature 256: 495-7, 1975), o por el método de ADN recombinante (Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sei. USA 81:3273-7, 1984), pero los métodos no se limitan a estos. Por ejemplo, al utilizar el método del hibridoma, se utiliza un oligómero beta A como un antígeno de sensibilización, y se lleva a cabo inmunización de acuerdo con un método de inmunización convencional. Las células inmunitarias obtenidas se fusionan con células progenitoras conocidas mediante un método de fusión celular convencional, y las células que producen anticuerpos monoclonales se pueden seleccionar y aislar utilizando un método de cribado convencional.

45 Se pueden producir los anticuerpos monoclonales de la presente invención, por ejemplo, como sigue. Primero, beta 1-42 A sintético (Peptide Institute, Inc., Osaka) se disuelve en agua desionizada destilada o una solución reguladora de fosfato 10 mM, y esta se incuba a 37 grados C durante 18 horas. Luego, los péptidos se separan por SDS-PAGE al 4-12% y se visualizaron mediante tinte CBB, y solo se corta la porción del tetrámero beta 1-42 A que no está contaminada por el monómero beta 1-42 A. A continuación, los ratones BALB/c se inmunizan en su almohadilla de pata con 2.5 micro g del tetrámero beta 1-42 A emulsificado utilizando adyuvante completo de Freund.

Posteriormente, se llevan a cabo seis veces inmunizaciones de refuerzo. Los hibridomas se producen desde el ganglio linfático inguinal mediante fusión con células Sp2/O-Ag14 utilizando polietilenglicol 1500.

5 En la presente invención, los animales inmunizados con antígenos de sensibilización no se limitan particularmente, sino que se seleccionan preferiblemente teniendo en cuenta la compatibilidad con las células progenitoras utilizadas para la fusión celular. Generalmente, se utilizan roedores, lagomorfos, o primates. Los roedores incluyen, por ejemplo, ratones, ratas y hámsters. Los lagomorfos incluyen, por ejemplo, conejos. Los primates incluyen, por ejemplo, catarrinos (monos del viejo mundo) como *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, *hamadryas*, y chimpancés.

10 Los animales se inmunizan con antígenos de sensibilización de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, como un método estándar, la inmunización se realiza al inyectar por vía intraperitoneal o subcutánea un antígeno de sensibilización en mamíferos.

Un ejemplo de las células progenitoras fusionadas con los inmunocitos mencionados anteriormente es la célula Sp2/O-Ag14, que se describirá adelante en los Ejemplos. Sin embargo, se pueden utilizar diversas otras estirpes celulares conocidas.

15 La fusión celular entre el inmunocito mencionado anteriormente y una célula de mieloma se puede llevar a cabo básicamente de acuerdo con métodos conocidos, que incluyen el método por Kohler y Milstein (Kohler G. and Milstein C, *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46).

20 Los hibridomas obtenidos de esta manera se seleccionan al cultivarlos en un medio de cultivo de selección convencional, tal como un medio de cultivo HAT, que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. El cultivo en el medio de cultivo HAT mencionado anteriormente se continúa generalmente durante varios días a varias semanas durante un tiempo adecuado para matar células diferentes a aquellas de los hibridomas deseados (células no fusionadas). A continuación, se realiza un método de dilución limitante convencional para cribar y clonar de forma individual un hibridoma que produce el anticuerpo deseado.

25 Después de eso, el hibridoma obtenido se trasplanta en la cavidad abdominal de un ratón, y se extrae el fluido ascítico que contiene los anticuerpos monoclonales deseados. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar a partir del fluido ascítico mediante métodos de separación y/o purificación de proteínas convencionales tales como una combinación seleccionada de cromatografía de columna, que incluye, pero no se limita a, cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, precipitación de sales, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, y método isoelectrónico (*Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and David Lane (edit.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

30 Se pueden utilizar columnas de Proteína A y columnas de Proteína G para columnas de afinidad. Ejemplos de las columnas de Proteína A utilizadas incluyen Hyper D, POROS y Sepharose FF (Pharmacia).

35 La cromatografía (excluyendo cromatografía de afinidad) incluye cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción ("Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual", Daniel R Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Cuando la cromatografía se lleva a cabo, se pueden utilizar métodos de cromatografía de fase líquida tal como HPLC y FPLC.

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales preparados de esta manera se pueden subcultivar en un medio de cultivo convencional, y se pueden almacenar durante un largo tiempo en nitrógeno líquido.

40 Se puede inmunizar cualquier mamífero utilizando un inmunógeno para la producción de anticuerpos. Sin embargo, al preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas de producción, preferiblemente se considera la compatibilidad con las células progenitoras utilizadas en la fusión celular para la producción de hibridoma.

45 En general, se utilizan roedores, lagomorfos, o primates para inmunización. Los roedores incluyen, por ejemplo, ratones, ratas y hámsters. Los lagomorfos incluyen, por ejemplo, conejos. Los primates incluyen, por ejemplo, catarrinos (monos del viejo mundo) tales como monos *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, *hamadryas*, y chimpancés.

50 El uso de animales transgénicos que tienen un repertorio de genes de anticuerpo humano se conoce en la técnica (Ishida I, et al., *Cloning and Stern Cells* 4: 91-102, 2002). Como con otros animales, para obtener anticuerpos monoclonales humanos, se inmunizan los animales transgénicos, luego las células que producen anticuerpos se recolectan de los animales y se fusionan con células de mieloma para producir hibridomas, y se pueden preparar anticuerpos humanos anti-proteína a partir de estos hibridomas (véase Publicaciones Internacionales Nos. WO92/03918, WO94/02602, WO94/25585, WO96/33735, y WO96/34096).

Alternativamente, se pueden utilizar linfocitos inmortalizados con oncogenes para la producción de anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, linfocitos humanos infectados con el virus EB o similar se inmuniza in vitro con inmunógenos. A continuación, los linfocitos inmunizados se fusionan con células de mieloma derivadas de humano (U266, etc.) capaces de división ilimitada, y por lo tanto se obtienen hibridomas que producen se obtienen los anticuerpos humanos deseados (Publicación Kokai de Solicitud de Patente Japonesa No. (JP-A) S63-17688 (solicitud de patente japonesa no examinada, publicada)).

Una vez que se pueden obtener los anticuerpos monoclonales por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, los anticuerpos también se pueden preparar utilizando métodos de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck CAK and Larrick JW, Therapeutic Monoclonal Antibodies, Macmillan Publishers, Reino Unido, 1990). Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos recombinantes al clonar los ADN que codifican los anticuerpos deseados a partir de células que producen anticuerpos tales como hibridomas o linfocitos inmunizados que producen los anticuerpos, luego insertar los ADN clonados en vectores apropiados, y transfectar los vectores en células anfitrionas adecuadas. Dichos anticuerpos recombinantes también se incluyen en la presente invención.

Ejemplos de anticuerpos monoclonales incluyen los siguientes: anticuerpos IR-003, IR-091, IR-099 (para el uso de acuerdo con la presente invención), IR-103, IR-130, y IR-148.

Para el anticuerpo IR-003:

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena H (VH) se muestran en la SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 97, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena L (VL) se muestran en la SEQ ID NO: 100 y SEQ ID NO: 99, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 5, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 7, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 11, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 13, respectivamente; y

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 15, respectivamente.

Para el anticuerpo IR-091:

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena H (VH) se muestran en la SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 101, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena L (VL) se muestran en la SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 103, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 21, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 23, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 25, respectivamente;

ES 2 614 949 T3

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 27, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 29, respectivamente; y

- 5 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 31, respectivamente.

Para el anticuerpo IR-099 (para el uso de acuerdo con la presente invención):

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena H (VH) se muestran en la SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 105, respectivamente;

- 10 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena L (VL) se muestran en la SEQ ID NO: 108 y SEQ ID NO: 107, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 37, respectivamente;

- 15 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 39, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 41, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 43, respectivamente;

- 20 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 45, respectivamente; y

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 47, respectivamente.

Para el anticuerpo IR-103:

- 25 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena H (VH) se muestran en la SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 109, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena L (VL) se muestran en la SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 111, respectivamente;

- 30 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 53, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 55, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 57, respectivamente;

- 35 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 59, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 61, respectivamente; y

- 40 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 63, respectivamente.

Para el anticuerpo IR-130:

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena H (VH) se muestran en la SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 113, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena L (VL) se muestran en la SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 115, respectivamente;

5 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 69, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 71, respectivamente;

10 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 73, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 76 y SEQ ID NO: 75, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 77, respectivamente; y

15 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 79, respectivamente.

Para el anticuerpo IR-148:

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena H (VH) se muestran en la SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 117, respectivamente;

20 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena L (VL) se muestran en la SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 119, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 85, respectivamente;

25 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 87, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena H se muestran en la SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 89, respectivamente;

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 91, respectivamente;

30 la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 93, respectivamente; y

la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena L se muestran en la SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 95, respectivamente.

35 Los anticuerpos incluyen minicuerpos. Un minicuerpo contiene un fragmento de anticuerpo que carece de una porción de un anticuerpo completo, y no se limita particularmente siempre que tenga la capacidad de unirse a un antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv. Ejemplos de minicuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv (Fv de cadena sencilla), díacuerpo, y sc(Fv)₂ ((Fv)₂ de cadena sencilla).

40 Estos minicuerpos se pueden obtener, por ejemplo, al tratar un anticuerpo con una enzima para producir un fragmento de anticuerpo. Las enzimas conocidas para producir un fragmento de anticuerpo incluyen papaína, pepsina, y plasmina. Alternativamente, se puede producir una construcción génica que codifica un fragmento de anticuerpo, insertar en un vector de expresión, y expresar en una célula anfitriona adecuada (véase, por ejemplo, Co, MS et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. and Horwitz, AH Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Plueckthun, A. and Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Lamoyi, E., Methods in

Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

5 Aquí, "fragmentos de unión a antígeno" significa los fragmentos de anticuerpo mencionados anteriormente que tienen capacidad de unión a antígeno, o minicuerpos que incluyen los fragmentos de anticuerpo que tiene capacidad de unión a antígeno. Los fragmentos de anticuerpo que se unen a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A, o fragmentos de anticuerpo que se unen a oligómeros beta A pero no a monómeros beta A y proteína precursora amiloide, también se incluyen en la presente invención. Después de eso, la referencia a "anticuerpo" incluye la referencia al "fragmento de unión a antígeno" anterior.

10 Los anticuerpos policlonales de la presente invención se pueden obtener mediante los siguientes métodos. Para obtener los anticuerpos policlonales, se extrae sangre de un mamífero sensibilizado con un antígeno después de que se inmuniza el mamífero con un oligómero beta A (por ejemplo, tetrámero beta A) como un antígeno de sensibilización utilizando un método convencional y se confirma que se incrementa el nivel en suero del anticuerpo deseado. Se separa el suero de la sangre mediante un método conocido. Cuando se utiliza un anticuerpo policlonal, se puede utilizar el suero que contiene el anticuerpo policlonal. Alternativamente, si es necesario, una fracción que contiene el anticuerpo policlonal se puede aislar a partir de suero y luego utilizar. Por ejemplo, la inmunoglobulina G o M se pueden preparar al obtener una fracción que reconoce específicamente un oligómero beta A utilizando una columna de afinidad acoplada con un oligómero beta A y, luego, purificar esta fracción utilizando una columna de Proteína A o Proteína G.

20 La presente especificación también se refiere a oligómeros beta A unidos por los anticuerpos divulgados. Preferiblemente, los anticuerpos incluyen los siguientes: los anticuerpos IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, y IR-148. Los oligómeros beta A se puede utilizar como antígenos para preparar anticuerpos, o vacunas.

En otras palabras, los oligómeros beta A son antígenos unidos por los siguientes anticuerpos: los anticuerpos IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, y IR-148.

25 Adicionalmente, los anticuerpos incluyen anticuerpos que se unen a los antígenos unidos por los siguientes anticuerpos: los anticuerpos IR-003, IR-091, IR-099 (para el uso de acuerdo con la presente invención), IR-103, IR-130, y IR-148.

Adicionalmente, la presente especificación proporciona un anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (12) adelante:

- (1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98;
- 30 (2) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100;
- (3) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102;
- (4) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 104;
- 35 (5) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106;
- (6) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 108;
- 40 (7) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 110;
- (8) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 112;
- (9) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 114;
- 45 (10) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116;

(11) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118;

(12) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR1, CDR2, y CDR3, que se identifican en VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 120.

5 Como se mencionó anteriormente, "CDR1, CDR2, y CDR3" se refiere a CDR determinado por un método bien conocido en la técnica (por ejemplo, véase Kabat, Elvin A., Secuencias of proteins of immunological interés 5th ed., National Institutes of Health, 1991; Chothia et al, J Mol Biol 196:901-917,1987). Es un conocimiento técnico común en el arte que las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3 se pueden identificar en las secuencias de aminoácidos de regiones, que incluyen CDR1, CDR2, y CDR3, utilizando un método bien conocido en la técnica. En las siguientes realizaciones, para cada anticuerpo, se muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de CDR determinada de acuerdo con la definición de Kabat.

El anticuerpo descrito es un cualquiera de (1) a (38) adelante.

Anticuerpo IR-003:

15 (1) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 como CDR3;

(2) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 como CDR3;

20 (3) un anticuerpo que comprende la cadena H de (1) y la cadena L de (2);

(4) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 como VH;

(5) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100 como VL;

25 (6) un anticuerpo que comprende la cadena H de (4) y la cadena L de (5);

Anticuerpo IR-091:

(7) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 como CDR3;

30 (8) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 como CDR3;

(9) un anticuerpo que comprende la cadena H de (7) y la cadena L de (8);

35 (10) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102 como VH;

(11) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 104 como VL;

(12) un anticuerpo que comprende la cadena H de (10) y la cadena L de (11);

Anticuerpo IR-099 (para el uso de acuerdo con la presente invención):

40 (13) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 como CDR3;

ES 2 614 949 T3

- (14) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 como CDR3;
- (15) un anticuerpo que comprende la cadena H de (13) y la cadena L de (14);
- 5 (16) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106 como VH;
- (17) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 108 como VL;
- 10 (18) un anticuerpo que comprende la cadena H de (16) y la cadena L de (17); anticuerpo IR-103: (19) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58 como CDR3;
- (20) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 como CDR3;
- 15 (21) un anticuerpo que comprende la cadena H de (19) y la cadena L de (20);
- (22) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 110 como VH;
- (23) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 112 como VL;
- 20 (24) un anticuerpo que comprende la cadena H de (22) y la cadena L de (23); Anticuerpo IR-130:
- (25) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74 como CDR3;
- 25 (26) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 como CDR3;
- (27) un anticuerpo que comprende la cadena H de (25) y la cadena L de (26);
- 30 (28) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 114 como VH;
- (29) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 como VL;
- (30) un anticuerpo que comprende la cadena H de (28) y la cadena L de (29);
- Anticuerpo IR-148:
- 35 (31) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 como CDR3;
- (32) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96 como CDR3;
- 40 (33) un anticuerpo que comprende la cadena H de (31) y la cadena L de (32);

(34) un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 como VH;

(35) un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 120 como VL;

5 (36) un anticuerpo que comprende la cadena H de (34) y la cadena L de (35);

(37) un anticuerpo que comprende una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en el anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (36), que tiene actividad equivalente al anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (36); y (38) un anticuerpo que se une al epítipo unido por el anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (36).

10 Anticuerpo IR-003:

Un ejemplo de la VH en la "cadena H mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 (secuencia de la CDR1 de cadena H de anticuerpo IR-003) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (secuencia de la CDR2 de cadena H del anticuerpo IR-003) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (secuencia de la CDR3 de cadena H del anticuerpo IR-003) como CDR3" de (1) es una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 (secuencia del anticuerpo IR-003 VH).

Un ejemplo de la VL en la "cadena L mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (secuencia de la CDR1 de cadena L del anticuerpo IR-003) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 (secuencia de la CDR2 de cadena L del anticuerpo IR-003) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 (secuencia de CDR3 de cadena L el anticuerpo IR-003 del anticuerpo IR-003) como CDR3" de (2) es una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, más preferiblemente una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100 (secuencia del anticuerpo IR-003 VL).

Anticuerpo IR-091:

Un ejemplo de la VH en la "cadena H mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 (secuencia de CDR1 de cadena H del anticuerpo IR-091) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 (secuencia de CDR2 de cadena H del anticuerpo IR-091) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 (secuencia de CDR3 de cadena H del anticuerpo IR-091) como CDR3" de (7) es una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102 (secuencia del anticuerpo IR-091 VH).

Un ejemplo de la VL en la "cadena L mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 (secuencia de la CDR1 de cadena L del anticuerpo IR-091) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 (secuencia de la CDR2 de cadena L del anticuerpo IR-091) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 (secuencia de la CDR3 de cadena L del anticuerpo IR-091) como CDR3" de (8) es una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, más preferiblemente una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 104 (secuencia del anticuerpo IR-091 VL).

35 Anticuerpo IR-099 (para el uso de acuerdo con la presente invención):

Un ejemplo de la VH en la "cadena H mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 (secuencia de la CDR1 de cadena H del anticuerpo IR-099) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 (secuencia de la CDR2 de cadena H del anticuerpo IR-099) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 (secuencia de la CDR3 de cadena H del anticuerpo IR-099) como CDR3" de (13) es una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106 (secuencia del anticuerpo IR-099 VH).

Un ejemplo de la VL en la "cadena L mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 (secuencia de la CDR1 de cadena L del anticuerpo IR-099) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46 (secuencia de la CDR2 de cadena L del anticuerpo IR-099) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 (secuencia de la CDR3 de cadena L del anticuerpo IR-099) como CDR3" de (14) es una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, más preferiblemente una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 108 (secuencia del anticuerpo IR-099 VL).

Anticuerpo IR-103:

5 Un ejemplo de la VH en la “cadena H mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54 (secuencia de la CDR1 de cadena H del anticuerpo IR-103 CDR1 de cadena H) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56 (secuencia de la CDR2 de cadena H del anticuerpo IR-103) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58 (secuencia de la CDR3 de cadena H del anticuerpo IR-103) como CDR3” de (19) es una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 110 (secuencia del anticuerpo IR-103 VH).

10 Un ejemplo de la VL en la “cadena L mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60 (secuencia de la CDR1 de cadena L del anticuerpo IR-103) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 (secuencia de la CDR2 de cadena L del anticuerpo IR-103) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 (secuencia de la CDR3 de cadena L del anticuerpo IR-103) como CDR3” de (20) es una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52, más preferiblemente una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 112 (secuencia del anticuerpo IR-103 VL).

Anticuerpo IR-130:

15 Un ejemplo de la VH en la “cadena H mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70 (secuencia del anticuerpo IR-130 CDR1 de cadena H) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72 (secuencia de la CDR2 de cadena H del anticuerpo IR-130) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74 (secuencia de la CDR3 de cadena H del anticuerpo IR-130) como CDR3” de (25) es una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 114 (secuencia del anticuerpo IR-130 VH).

20 Un ejemplo de la VL en la “cadena L mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 (secuencia de la CDR1 de cadena L del anticuerpo IR-130) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 (secuencia de la CDR2 de cadena L del anticuerpo IR-130) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 (secuencia de la CDR3 de cadena L del anticuerpo IR-130) como CDR3” de (26) es una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68, más preferiblemente una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 (secuencia del anticuerpo IR-130 VL).

Anticuerpo IR-148:

30 Un ejemplo de la VH en la “cadena H mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86 (secuencia de la CDR1 de cadena H del anticuerpo IR-148) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88 (secuencia de la CDR2 de cadena H del anticuerpo IR-148) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 (secuencia de la CDR3 de cadena H del anticuerpo IR-148) como CDR3” de (31) es una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 (secuencia del anticuerpo IR-148 VH).

35 Un ejemplo de la VL en la “cadena L mencionada anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92 (secuencia de la CDR1 de cadena L del anticuerpo IR-148) como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94 (secuencia de la CDR2 de cadena L del anticuerpo IR-148) como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96 (secuencia de la CDR3 de cadena L del anticuerpo IR-148) como CDR3” de (32) es una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84, más preferiblemente una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 120 (secuencia del anticuerpo IR-148 VL).

40 Las cadenas H, cadenas L, VHs, y VLs mencionadas anteriormente se pueden utilizar para preparar los anticuerpos de la presente invención. La presente invención también se relaciona con las cadenas H, cadenas L, VHs, y VLs mencionadas anteriormente.

45 Los anticuerpos de (1) a (38) mencionados anteriormente no solo incluyen anticuerpos monovalentes sino también anticuerpos multivalentes con dos o más valencias. Los anticuerpos multivalentes de la presente invención incluyen anticuerpos multivalentes cuyos sitios de unión a antígeno son todos iguales y los anticuerpos multivalentes cuyos sitios de unión a antígeno son parcial o completamente diferentes.

50 En una realización preferida, el anticuerpo mencionado anteriormente de (37) es un anticuerpo sin CDR modificadas. Por ejemplo, el “anticuerpo que comprende una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en el anticuerpo de (1), que tiene actividad equivalente como el anticuerpo de (1)” del anticuerpo mencionado anteriormente de (37) es preferiblemente “un anticuerpo que tiene actividad equivalente como el anticuerpo de (1), y comprende una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en el anticuerpo de (1), y comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 como CDR3”. Otro anticuerpo preferido del anticuerpo mencionado anteriormente de (37) se puede expresar en una forma similar.

Sin embargo, el anticuerpo mencionado anteriormente de (37) no excluye un anticuerpo en el que la CDR(s) se modifica/modifican. Aquellos expertos en la técnica pueden modificar una secuencia de aminoácidos de CDR sin perder una actividad equivalente. Se pueden predecir mutaciones de aminoácidos sin perder una actividad equivalente, por ejemplo, utilizando técnicas de modelado molecular.

5 Por lo tanto, para el anticuerpo mencionado anteriormente de (37), un anticuerpo que tiene una actividad equivalente como un anticuerpo que tiene una CDR de cadena H y/o CDR de cadena L de: el anticuerpo IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, o IR-148 se puede expresar como sigue:

10 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: c como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene:

como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a;

15 como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b;

20 como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c;

un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena L que tiene:

25 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d;

30 como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e;

como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f; o

35 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c como CDR3, y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende:

40 una cadena H que tiene:

como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a;

45 como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b;

como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c y

una cadena L que tiene:

5 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d;

10 como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e;

como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f.

15 El anticuerpo de (37) para cada uno de los anticuerpos anteriores se puede expresar mediante referencia a al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR1 de cadena H para "a" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR2 de cadena H para "b" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR3 de cadena H para "c" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR1 de cadena L para "d" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR2 de cadena L para "e" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR3 de cadena L para "f" anterior. Por ejemplo, el anticuerpo de (37) para un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que tiene la CDR de cadena H y/o
20 CDR de cadena L del anticuerpo IR-003 se puede expresar como sigue:

un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene:

25 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

30 como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;

35 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena L que tiene:

40 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;

como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

45 como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; o

un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 como CDR3, y una cadena L que tiene la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende: una cadena H que tiene:

5 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

10 como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y

una cadena L que tiene:

15 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;

como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

20 como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

25 Adicionalmente, como se mencionó anteriormente, con respecto a los anticuerpos mencionados adelante, el anticuerpo de (37) para cada uno de los anticuerpos se puede expresar mediante referencia a al aminoácido de la SEQ ID NOs de VH, VL, CDR de: el anticuerpo IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, o IR-148 para "a" a "h".

30 En los anticuerpos anteriores en los que se modifican las CDR, "diversos" significa, preferiblemente cinco aminoácidos o menos, más preferiblemente cuatro aminoácidos o menos, más preferiblemente tres aminoácidos o menos, más preferiblemente dos aminoácidos. Se puede identificar el número de aminoácidos sustituidos, eliminados, agregados y/o insertados entre dos secuencias de aminoácidos al alinear las secuencias de aminoácidos utilizando programas de análisis de secuencia. Los programas para para alineación incluyen, por ejemplo, FASTA (Lipman DJ, Pearson WR (1985) Science 227 (4693):1435-1441; Pearson, WR.,Lipman, DJ (1988) Proc. Natl. Acad. Sei. USA 85 (8): 2444-2448), BLAST(Altschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschule et al (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402).

35 Se conoce por aquellos expertos en la técnica que, en la especificidad o afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno, la CDR3 cumple una función particularmente importante. Por lo tanto, en los anticuerpos de (37), preferiblemente se conserva la secuencia de CDR3. Por lo tanto, preferiblemente el anticuerpo de (37) se puede expresar como sigue:

40 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene:

como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a;

45 como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b;

como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c;

un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena L que tiene:

5 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d;

10 como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e;

15 como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f; o un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c como CDR3, y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f como CDR3, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende:

una cadena H que tiene:

20 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a;

como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b;

como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c y

25 una cadena L que tiene:

como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d;

30 como CDR2, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, o una secuencia de aminoácidos con una o diversas sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e;

como CDR3, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f.

Con respecto a los anticuerpos de (37), un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que tiene la VH y/o VL de:

35 el anticuerpo IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, o IR-148 se puede expresar como sigue:

40 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: g, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene VH que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: g;

45 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: h, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene VL que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: h; o

un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: g y una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: h, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende

5 una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: g, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: g, y una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: h, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: h.

10 El anticuerpo de (37) para cada uno de los anticuerpos anteriores se puede expresar mediante referencia a al aminoácido de la SEQ ID NO de VH para "g" anterior, y al aminoácido de la SEQ ID NO de VL para "h" anterior. Por ejemplo, el anticuerpo de (37) para un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que tiene la VH y/o cadena VL del anticuerpo IR-003 se puede expresar como sigue:

15 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene VH que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/ o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98;

20 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene VL que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/ o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100; o

25 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 y una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, y

30 una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100.

35 En los anticuerpos anteriores en los que VH y/o VL se modifican, "diversos" significa, preferiblemente 50 aminoácidos o menos, 30 aminoácidos o menos, 20 aminoácidos o menos, 15 aminoácidos o menos, o 10 aminoácidos o menos, más preferiblemente nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, o dos aminoácidos. Siempre que se retenga la actividad equivalente, no se limitan particularmente las posiciones de los aminoácidos modificados; sin embargo, preferiblemente se modifican los aminoácidos en FR.

Por lo tanto, en una realización preferida, entre los anticuerpos de (37), un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que tiene la VH y/o VL de:

el anticuerpo IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, o IR-148 se puede expresar como sigue:

40 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene VH que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d como CDR3; un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena L que tiene VL que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: g como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: h como CDR3; o

50

un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a y VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende:

5 una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: c como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: d como CDR3, y

10 una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: e, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: f como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: g como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: h como CDR3.

15 El anticuerpo de (37) para cada uno de los anticuerpos anteriores se puede expresar mediante referencia a al aminoácido de la SEQ ID NO de VH para "a" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR1 de cadena H para "b" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR2 de cadena H para "c" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR3 de cadena H para "d" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de VL para "e" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR1 de cadena L para "f" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR2 de cadena L para "g" anterior, al aminoácido de la SEQ ID NO de CDR3 de cadena L para "h" anterior. Por ejemplo, el anticuerpo de (37) para un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que tiene la VH y/o VL del anticuerpo IR-003 se puede expresar como sigue:

20 un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena H que tiene VH que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/ o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 como CDR3; un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende una cadena L que tiene VL que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/ o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 como CDR3; o un anticuerpo que tiene actividad equivalente como un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, en la que el "anticuerpo que tiene actividad equivalente" comprende:

35 una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 como CDR3, y

40 una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, o una secuencia de aminoácidos en la que uno o diversos aminoácidos se sustituyen, eliminan, agregan, y/o insertan en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 como CDR3.

45 En los anticuerpos modificados que tienen la CDR de cadena H y/o CDR de cadena L, o VH y/o VL de: el anticuerpo IR-003, IR- 091, IR-099, IR-103, IR-130, o IR-148, preferiblemente se conservan las modificaciones de aminoácido y sustituciones de aminoácido, como se describe adelante en detalle. Por lo tanto, en una realización más preferida, en los anticuerpos de (37) descritos anteriormente, se puede realizar la "Sustitución de aminoácido conservadora", en lugar de "Sustitución, eliminación, adición, y/o inserción".

50 Los métodos para preparar un polipéptido que tiene actividad equivalente a aquella de un determinado polipéptido que es bien conocidos por aquellos expertos en la técnica incluyen métodos para introducir mutaciones en un polipéptido. Por ejemplo, un experto en la técnica puede preparar un anticuerpo que tiene actividad equivalente a aquella de un anticuerpo de la presente invención al introducir mutaciones apropiadas en el anticuerpo mediante mutagénesis dirigida a sitio (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152,

55 271-275; Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W, and Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) Proc. Natl.

Acad. Sei. USA. 82, 488-492; Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) y dichas mutaciones de aminoácido también pueden ocurrir de forma natural. Los anticuerpos descritos también incluyen un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos con una o más mutaciones de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de la presente invención, y que tiene actividad equivalente a aquella del anticuerpo descrito.

5 Los residuos de aminoácido preferiblemente se mutan en otros aminoácidos que conservan las propiedades de las cadenas laterales de aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos se categorizan como sigue dependiendo de las propiedades de cadena lateral: aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, y V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, y T), aminoácidos con cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I, y P), aminoácidos con cadenas laterales que contienen hidroxilo (S, T, y Y), aminoácidos con cadenas laterales que contienen un átomo de azufre (C y M), aminoácidos con cadenas laterales que contienen ácido carboxílico y amida (D, N, E, y Q), aminoácidos con cadenas laterales básicas (R, K, y H), y aminoácidos con cadenas laterales que contienen anillo aromático (H, F, Y, y W) (los aminoácidos se representan por códigos de una letra en paréntesis). "Sustitución de aminoácido conservadora" se refiere a la Sustitución de un aminoácido con otro aminoácido con unas características conservadas de cadena lateral de aminoácidos. En los anticuerpos de (37), las mutaciones de secuencia de aminoácidos en un anticuerpo son preferiblemente "sustituciones de aminoácido conservadoras".

En general, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos, en el que uno o más o más residuos de aminoácidos se modifican (eliminan, agregan, y/o sustituyen con otros aminoácidos) en una determinada secuencia de aminoácidos, se conoce por retener su actividad biológica original (función).

Adicionalmente a las modificaciones mencionadas anteriormente, los anticuerpos descritos se pueden conjugar con otras sustancias, siempre que se mantenga la actividad. Ejemplos de las sustancias incluyen péptidos, lípidos, azúcares y cadenas de azúcar, grupos acetilo, y polímeros naturales y sintéticos. Estas modificaciones se pueden realizar para conferir funciones adicionales a los anticuerpos, o para estabilizar los anticuerpos.

Los anticuerpos en los que se han agregado diversos residuos de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de la presente invención incluyen proteínas de fusión que contienen el anticuerpo. En las proteínas de fusión, el anticuerpo se fusiona con otro péptido o proteína. Los métodos para producir una proteína de fusión se pueden llevar a cabo mediante ligación de un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención en la estructura con un polinucleótido que codifica otro péptido o polipéptido, e insertar este en un vector de expresión, y ex-presionar la construcción de fusión en un anfitrión. Las técnicas conocidas para aquellos expertos en la técnica se pueden utilizar para este propósito. Los péptidos o polipéptidos fusionados con un anticuerpo de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellos péptidos conocidos, tales como FLAG (Hopp, TP et al., *Biotechnology* (1988) 6, 1204-1210), 6x His que consiste de seis residuos de histidina (His), 10x His, hemaglutinina de gripe (HA), fragmentos c-myc humanos, fragmentos VSV-GP, fragmentos p18HIV, T7-tag, HSV-tag, E-tag, fragmentos de antígeno SV40T, Ick tag, fragmentos de alfa-tubulina, B-tag, y fragmentos de Proteína C; glutatión-S-transferasa (GST); regiones constantes de inmunoglobulina; beta-galactosidasa; y proteína de unión a maltosa (MBP), etc. Los polinucleótidos comercialmente disponibles que codifican estos péptidos o polipéptidos se pueden fusionar con los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente invención, y los polipéptidos de fusión se pueden producir al expresar los polinucleótidos de fusión preparadas de este modo.

Los anticuerpos descritos pueden diferir en la secuencia de aminoácidos, peso molecular, presencia o ausencia de cadenas de azúcar, estructura y similares, dependiendo de la célula o anfitrión que produce los anticuerpos o el método de purificación. Sin embargo, siempre que el anticuerpo obtenido tiene un equivalente de actividad para un anticuerpo descrito, se incluyen en la presente descripción.

Aquí, "actividad equivalente" significa que el anticuerpo de interés tiene la misma actividad biológica o bioquímica como un anticuerpo descrito. La "actividad" incluye, por ejemplo, la actividad de unirse específicamente a oligómeros beta A pero no unirse a monómeros beta A, la actividad para unirse específicamente a oligómeros beta A pero no unirse a monómeros beta A y proteína precursora amiloide, la actividad anti-neurotóxica, la actividad supresora de formación de fibrillas de amiloide beta A, la actividad de toxicidad anti-sináptica, la actividad de deterioro anti-memoria, la actividad de depósito beta anti-A, actividad de formación de placa positiva a anti-tioflavina S, y actividad de acumulación de oligómero beta anti-A.

Preferiblemente, la "actividad" es la actividad de unir específicamente oligómeros beta A pero no unir monómeros beta A. Como se muestra en el Ejemplo, la "actividad para unirse específicamente a oligómeros beta A pero no unirse a monómero beta A" preferiblemente se evalúa mediante transferencia dot o ELISA de competencia. Los métodos específicos de transferencia dot o ELISA de competición incluyen métodos descritos en los Ejemplos. Adicionalmente, la actividad de unión hacia los oligómeros y monómeros beta A se puede evaluar por otros métodos de inmunodetección, por ejemplo, medición de absorbancia, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), método de inmunofluorescencia, etc. por ejemplo, en ELISA, un anticuerpo se inmoviliza sobre una placa, se agrega un antígeno para el anticuerpo a la placa, y se agrega un sobrenadante de cultivo de células que producen anticuerpos o un anticuerpo purificado. Luego, se

agrega un anticuerpo secundario que reconoce un anticuerpo primario y que está marcado con una enzima tal como fosfatasa alcalina, y se incuba la placa. Después del lavado, se agrega un Sustrato enzimático tal como fosfato de p-nitrofenilo a la placa, y se mide la absorbancia para evaluar la capacidad de unión al antígeno de una muestra de interés. Las capacidades de unión para oligómeros y monómeros beta A se miden preferiblemente por el mismo método; sin embargo, se pueden medir por diferentes métodos. Por ejemplo, la unión a oligómeros beta A se puede analizar utilizando Biacore (GE Healthcare Sciences).

Cuando la "actividad" es la actividad para unirse específicamente a oligómeros beta A pero no unirse a monómeros beta A y proteína precursora amiloide, se puede evaluar la actividad por los métodos mencionados anteriormente o métodos descritos en los Ejemplos.

When the "activity" is anti-neurotoxic activity, this activity can be assessed by, for example, culturing neurons with A beta in the presence or absence of an antibody, and measuring the A beta-induced cytotoxicity level inhibited by the antibody. A beta-induced cytotoxicity can be measured by, for example, live/ dead two color fluorescent assay, measurement of the LDH amount derived from dead cells released into a medium. For the measurement of the LDH amount, for example, CytoTox96 (Promega) or such can be used. Specific methods for measuring anti-neurotoxic activity include the methods described in the Examples.

Cuando la "actividad" es actividad anti-neurotóxica, se puede evaluar esta actividad al, por ejemplo, cultivar neuronas con beta A en la presencia o ausencia de un anticuerpo, y medir el nivel de citotoxicidad inducida por beta A inhibido por el anticuerpo. Una citotoxicidad inducida por beta puede medirse, por ejemplo, mediante un ensayo fluorescente de dos colores vivo/muerto, medición de la cantidad de LDH derivada de células muertas liberadas en un medio. Para la medición de la cantidad de LDH, por ejemplo, CytoTox96 (Promega) o similar se puede utilizar. Los métodos específicos para medir la actividad anti-neurotóxica incluyen los métodos descritos en los Ejemplos.

Cuando la "actividad" es la actividad de suprimir la formación de fibrilla amiloide beta A, se puede evaluar esta actividad, por ejemplo, al incubar una solución beta A con o sin un anticuerpo, y detectar el nivel de formación de fibrilla amiloide beta A suprimido por el anticuerpo. Se evalúa la cantidad de fibrillas de amiloide beta A, por ejemplo, al agregar una solución ThT (Tioflavina T) a un cultivo, y la cantidad de ThT unida a fibrillas amiloides con fluorescencia ThT. Los métodos específicos para medir una actividad supresora de formación de fibrillas de amiloide beta A incluyen los métodos descritos en los Ejemplos.

Cuando la "actividad" es la actividad de toxicidad anti-sináptica, se puede evaluar esta actividad, por ejemplo, al detectar el efecto que suprime la toxicidad sináptica mediante la administración de anticuerpos a ratones mutantes que expresan gen de APP humano mutante (por ejemplo, los ratones Tg2576, Taconics, EE.UU.). La evaluación de la toxicidad sináptica se puede realizar mediante la prueba de deterioro de memoria de ratón, el análisis del número de neuritas distróficas inflamadas utilizando un anticuerpo anti-sinaptofisina, el análisis de inmunofluorescencia de secciones de cerebro de ratón utilizando anticuerpos de anti-sinaptofisina o anti-drebrina. Cuando la "actividad" de la presente invención es la actividad de deterioro anti-memoria, esta actividad se evalúa mediante la prueba de deterioro de memoria utilizando ratones que expresan genes APP mutantes. Si la "actividad" de la presente invención es una actividad de depósito beta anti-A, la actividad de formación de la placa positiva a anti-tioflavina S, o una actividad de acumulación de oligómeros beta anti-A, estas actividades se pueden evaluar mediante la prueba de administración de anticuerpos utilizando ratones que expresan gen APP mutante.

Los métodos específicos para medir la actividad de deterioro anti-memoria, actividad de toxicidad anti-sináptica, actividad de depósito de beta anti-A, actividad de formación de placa positiva a anti-tioflavina S, y actividad de acumulación de oligómeros beta anti-A incluyen el siguiente método.

A los ratones hembra no transgénicos (no Tg) para control, y a ratones Tg2576 que tienen y que sobrexpresan el gen APP humano mutante tipo Sueco con mutaciones dobles (K670N y M671L) derivados de AD familiar se le administra el anticuerpo de la presente invención (dosificación dentro del rango de 0.4 a 5.0 mg/kg/p) o PBS en la vena caudal. La edad del ratón al inicio de la administración es de seis meses o más, en los que se expresan deterioros de memoria y aprendizaje, para monitorizar el efecto terapéutico; o cuatro meses para monitorizar el efecto profiláctico. El periodo de administración de anticuerpos es de dos meses para monitorizar el efecto terapéutico, y nueve meses para monitorizar el efecto profiláctico. Para medir la actividad de deterioro anti-memoria, los siguientes tres paradigmas de comportamiento se analizan después del periodo de administración del anticuerpo (Mouri A, FASEB J, 21: 2135-2148, 2007): (1) prueba de laberinto tipo Y para la memoria a corto plazo; (2) prueba de reconocimiento de objeto novedoso; (3) prueba de condicionamiento de miedo contextual. Para evaluar las otras actividades, los ratones se sacrifican después del análisis de comportamiento, y los hemisferios cerebrales se cortan en secciones sagitales de corte m de 10 a 30 micro de grosor utilizando un cryotome (RM 2145; Leica, Wetzlar, Alemania). Para observar la formación de placa positiva a tioflavina S, se realiza tinte con tioflavina S como se describe en Wyss-Coray et al., 2001. Se observa la formación de neuritas distróficas inflamadas utilizando un anticuerpo anti-sinaptofisina (Chemicon, Temecula, CA). Para cada ratón, se calculan el número de placas positivas a tioflavina S y las neuritas distróficas inflamadas positivas a sinaptofisina en cuatro o cinco secciones de un

hemisferio cerebral con un aumento de 40 veces. Para observar el depósito beta A, las secciones de serie brevemente tratadas previamente con ácido fórmico o Proteasa K se tiñen utilizando un kit de inmunotecnido beta A (Sigma, St. Louis, MO) o anticuerpo policlonal beta anti-A (Biosource), y se visualizaron señales inmunopositivas utilizando un kit de élite ABC (Vector Laboratories). Las imágenes de la corteza cerebral y el hipocampo se graban utilizando una cámara digital conectada con un microscopio, y se analizan utilizando un software PCI sencillo (Imaging System compix, Lake Oswego, OR). Se determinó el número de placas positivas a tioflavina S y las neuritas distróficas inflamadas positivas a sinaptofisina en una forma doble ciego. Se observa degeneración sináptica mediante inmunotecnido utilizando anticuerpos anti-sinaptofisina o anti-drebrina. Para evaluar la actividad de depósito de oligómeros beta anti-A, se preparan homogeneizados de cerebro del otro hemisferio cerebral del mismo ratón utilizando el método de Kawarabayashi et al., J. Neuroscience 2001), y la cantidad de oligómeros beta A se mide mediante SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia. Para los anticuerpos de detección, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales de oligómeros beta anti-A disponibles comercialmente (por ejemplo, 6E10, Covance Immuno-Technologies, Dedham, MA) o anticuerpos policlonales (por ejemplo, All, Biosource, Carmarillo, CA).

El término "equivalente" en "actividad equivalente" significa que un valor obtenido como una actividad bioquímica o biológica difiere dentro del 20% entre dos anticuerpos en comparación. La diferencia del valor de actividad está, preferiblemente dentro de 15%, dentro de 10%, dentro de 5%, o dentro de 2.5%. Los anticuerpos que se unen a un epítipo al que se une un anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (36) anterior se puede obtener mediante los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener los anticuerpos al (i) determinar el epítipo unido por el anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (36) utilizando un método convencional, y producir los anticuerpos utilizando un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos incluida en el epítipo como un inmunógeno; o (ii) determinar los epítipos de anticuerpos producidos por un método convencional, y seleccionar anticuerpos cuyo epítipo es el mismo como aquel del anticuerpo de uno cualquiera de (1) a (36).

Los anticuerpos mencionados anteriormente de (1) a (38) también incluyen cualquier tipo de anticuerpos tales como los minicuerpos descritos anteriormente, anticuerpos secuencias de aminoácidos modificadas tales como anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos, anticuerpos de animales no humanos, anticuerpos humanos, anticuerpos modificados conjugados a otras moléculas (por ejemplo, polímeros tales como polietilenglicol), y anticuerpos modificados por cadena de azúcar.

Preferiblemente los anticuerpos descritos incluyen:

los anticuerpos IR-003, IR-091, IR-099 (para uso de acuerdo con la presente invención), IR-103, IR-130, y IR-148. Estos anticuerpos se pueden obtener por el método descrito en los Ejemplos. Alternativamente, se pueden preparar los anticuerpos con base en su Información de secuencia.

Preferiblemente los anticuerpos descritos incluyen anticuerpos modificados tales como anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados. Los anticuerpos quiméricos más preferidos incluyen anticuerpos que comprenden una región variable derivada de:

los anticuerpos IR-003, IR-091, IR-099 (para uso de acuerdo con la presente invención), IR-103, IR-130, o IR-148; y una región constante derivada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados más preferidos incluyen anticuerpos que comprenden CDR derivada de: el anticuerpo IR-003, IR-091, IR-099 (para uso de acuerdo con la presente invención), IR-103, IR- 130, o IR-148; y FR derivada de inmunoglobulina humana, y una región constante derivada de inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos quiméricos anteriores se puede expresar como sigue:

un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, y CH de un anticuerpo humano;

un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b, y CL de un anticuerpo humano; o

un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, y CH de un anticuerpo humano, y una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b, y CL de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos quiméricos preferidos de cada uno de los anticuerpos anteriores se pueden expresar mediante referencia a al aminoácido de la SEQ ID NO de VH para "a" anterior, y al aminoácido de la SEQ ID NO de VL para "b" anterior. Por ejemplo, anticuerpos quiméricos para el anticuerpo IR-003 se puede expresar como sigue:

un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, y CH de un anticuerpo humano;

5 un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, y CL de un anticuerpo humano; o un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, y CH de un anticuerpo humano, y una cadena L que tiene VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, y CL de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos anteriores humanizados se pueden expresar como sigue:

un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, FR de VH de un anticuerpo humano, y CH de un anticuerpo humano;

10 un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: b, FR de VL de un anticuerpo humano, y CL de un anticuerpo humano; o

15 un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: a, FR de VH de un anticuerpo humano, y CH de un anticuerpo humano, y una cadena L que tiene CDR de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: b, FR de VL de un anticuerpo humano, y CL de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos humanizados de cada uno de los anticuerpos anteriores se pueden expresar mediante referencia a al aminoácido de la SEQ ID NO de VH para "a" anterior, y al aminoácido de la SEQ ID NO de VL para "b" anterior. Por ejemplo, anticuerpos humanizados para el anticuerpo IR-003 se puede expresar como sigue:

20 un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, FR de VH de un anticuerpo humano, y CH de un anticuerpo humano;

un anticuerpo que comprende una cadena L que tiene CDR de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, FR de VL de un anticuerpo humano, y CL de un anticuerpo humano; o

25 un anticuerpo que comprende una cadena H que tiene CDR de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, FR de VH de un anticuerpo humano, y CH de un anticuerpo humano, y una cadena L que tiene CDR de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100, FR de VL de un anticuerpo humano, y CL de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos anteriores modificados se pueden producir utilizando métodos conocidos.

Dado que se reduce la antigenicidad de un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado en el cuerpo humano, dicho anticuerpo es útil para administración a humanos con propósitos terapéuticos o similares.

30 Se producen los anticuerpos quiméricos al combinar secuencias derivadas de diferentes animales. Ejemplos de anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos que comprenden las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano. La producción de anticuerpos quiméricos se puede llevar a cabo utilizando métodos (véase, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522-5, 1986; Riechmann et al., Nature 332:323-7, 1988; y Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2:593-6, 1992). Por ejemplo, primero, los genes que codifican las regiones variables o CDRs del anticuerpo de interés se preparan de los ARN de células que producen anticuerpos mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) o similar (véase, por ejemplo, Larrick et al., "Methods: a Companion to Methods in Enzymology", Vol. 2: 106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies" in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application; Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press, 1995, and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications; and Birch et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc., 1995). Para preparar anticuerpos quiméricos a partir uno cualquiera de los anticuerpos AL-201 a AL-333, un gen que codifica una región variable o CDR se puede sintetizar con base en la Información de secuencia de cada uno de los anticuerpos divulgados aquí. Los genes preparados que codifican las regiones variables o CDR se ligan a genes que codifican las regiones constantes (por ejemplo, regiones constantes de anticuerpos humanos) o regiones de estructura (por ejemplo, regiones de estructura de anticuerpos humanos). Los genes que codifican las regiones constantes o regiones de estructura se pueden determinar de una manera similar a aquella para los genes que codifican la región variable o que codifican CDR, o alternativamente, se pueden preparar sobre la base de la Información de secuencia de los anticuerpos conocidos. Las secuencias de ADN que codifican productos quiméricos y productos injertados con CDR se pueden sintetizar completa o parcialmente utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, se puede realizar la síntesis de oligonucleótidos descrita por Jones et al. (Nature 321: 522-5, 1986). Adicionalmente, en algunos casos, la mutagénesis dirigida al

sitio y técnicas de reacción en cadena de polimerasa se pueden utilizar apropiadamente. Las técnicas para mutagénesis específica a oligonucleótidos de regiones variables conocidas descritas por Verhoeyen et al. (Science 239: 1534-6, 1988) y Riechmann et al. (Nature 332: 323-7, 1988) se pueden utilizar para modificar las secuencias de región variable, por ejemplo, para mejorar la capacidad de unión de anticuerpos quiméricos. Adicionalmente, si es necesario, se puede realizar relleno enzimático de oligonucleótidos con brechas utilizando polimerasa de ADN T4, por ejemplo, como se describe por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-33, 1989; y WO 90/07861).

Por ejemplo, las técnicas de injerto de CDR son conocidas en la técnica ("Immunoglobulin genes", Academic Press (London), pp 260-74, 1989; and Michael A et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-73, 1994). Utilizando las técnicas, las CDR de un determinado anticuerpo se reemplazan con las CDR de otro anticuerpo. A través de dicho reemplazo, la especificidad de unión del anticuerpo anterior se cambia a aquel de este último anticuerpo. Entre dichos anticuerpos quiméricos, aquellos en los que los aminoácidos de estructura se derivan de un anticuerpo humano son llamados "anticuerpos humanizados (anticuerpos injertados con CDR)". Al utilizar los anticuerpos para tratar humanos, se utilizan preferiblemente los anticuerpos humanos o anticuerpos humanizados.

En general, los anticuerpos quiméricos comprenden las regiones variables de un anticuerpo derivado de mamífero no humano y las regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano. Por otra parte, los anticuerpos humanizados comprenden las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de mamífero no humano y las regiones de estructura y regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano.

Después de producir los anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, los aminoácidos en las regiones variables (por ejemplo, FRs) o las regiones constantes se pueden sustituir con otros aminoácidos.

El origen de las regiones variables de los anticuerpos quiméricos o las CDR de los anticuerpos humanizados no se limita particularmente.

Se utilizan las regiones C derivadas de anticuerpo humano se utilizan para las regiones C de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Por ejemplo, se puede utilizar gama1 C, gama2 C, gama3 C, gama4 C, mu C, delta C, alfa1 C, alfa2 C, y épsilon C para las regiones C de cadena H, y kappa C y lambda C se puede utilizar para las regiones C de cadena L. Se conocen sus secuencias. Adicionalmente, se pueden modificar las regiones del anticuerpo humano C para mejorar la estabilidad de los anticuerpos o su producción.

La descripción proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anteriores de los mismos.

Los polinucleótidos no se limitan particularmente siempre que codifican los anticuerpos de la presente invención, y puede ser un ADN o ARN. Adicionalmente, pueden incluir una base no natural. Los polinucleótidos se pueden utilizar para producir los anticuerpos descritos mediante técnicas de ingeniería genética.

Se pueden obtener los polinucleótidos al aislar el mRNA a partir de células que producen anticuerpos que producen un anticuerpo de la presente invención, obtener cADN mediante reacción de transcripción inversa, y amplificar el cADN obtenido por PCR o similar, como se describe en los Ejemplos.

Los polinucleótidos preferidos incluyen un polinucleótido que codifica un anticuerpo que comprende la CDR de cadena H y/o CDR de cadena L de cada uno de los siguientes anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos: el anticuerpo IR-003, IR-091, IR-099 (para el uso de acuerdo con la presente invención), IR-103, IR-130, o IR-148.

Alternativamente, los polinucleótidos incluyen un polinucleótido que codifica un anticuerpo que comprende la VH y/o VL de cada uno de los siguientes anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos: al anticuerpo IR-003, IR-091, IR-099 (para el uso de acuerdo con la presente invención), IR-103, IR-130, o IR-148.

En las realizaciones anteriores, se pueden obtener los polinucleótidos al sintetizar los polinucleótidos basados en la Información de secuencia de aminoácidos de cada uno de los anticuerpos anteriores descritos aquí.

Adicionalmente, la descripción proporciona vectores que comprenden los polinucleótidos descritos. Los vectores con preferiblemente vectores de expresión para expresar un anticuerpo descrito en una célula anfitriona. Los vectores se pueden utilizar para producir los anticuerpos descritos.

Los vectores preferiblemente comprenden una secuencia de promotor que permite la expresión en una célula anfitriona, además de un polipéptido descrito. Adicionalmente, pueden comprender una secuencia señal para la secreción de un anticuerpo descrito. Adicionalmente, pueden comprender un gen marcador para la selección de una célula anfitriona en la que se ha introducido un vector descrito. Los componentes comprendidos en los vectores no

se limitan a la misma, y pueden ser un componente adecuado apropiadamente seleccionado por aquellos expertos en la técnica.

5 Por ejemplo, los vectores de expresión para la expresión de E. coli incluyen vectores que tienen "ori" para amplificación en E. coli, y tienen un promotor tal como el promotor lacZ (Ward et al., Nature (1989) 341, 544- 546; FASEB J. (1992) 6, 2422 a 2427), el promotor araB (Better et al, Science (1988) 240, 1041-1043), o promotor T7, y un gen marcador tal como un gen resistente a fármaco contra ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol, etc. los vectores incluyen vectores M13, vectores pUC, pBR322, pBluescript, pCR-script, etc. Adicionalmente, para una secuencia señal, la secuencia de señal pelB (Lei, SP et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) o tales se pueden utilizar.

10 Los vectores de la presente invención diferentes de vectores de expresión de E. coli incluyen, por ejemplo, vectores de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322), pEF, pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insecto (por ejemplo, Sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC (Gibco BRL), pBacPAK8), vectores de expresión derivados de vegetales (por ejemplo, pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus de animales (por ejemplo, pHSV, pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (por ejemplo, pZIPneo), vectores de expresión derivados de levadura (por ejemplo, Kit de Expresión Pichia (Invitrogen)), pNV11, SP-Q01), y vectores de expresión derivados de Bacillus (por ejemplo, pPL608, pKTH50).

20 Los vectores de expresión para la expresión en células animales tales como células CHO, células COS, células NIH3T3 incluyen vectores que tienen un promotor tal como el promotor SV40 (Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108), promotor MMTV-LTR, promotor EF1 alfa (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), el promotor CMV, o similar; y un gen marcador tal como gen de resistencia a fármacos contra neomicina, G418, etc. Estos vectores incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13, etc. Como una secuencia señal, se puede utilizar cualquiera de aquellas descritas en los ejemplos.

25 Adicionalmente, la descripción proporciona células anfitrionas que producen un anticuerpo descrito, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Las células anfitrionas incluyen células que tienen un polinucleótido descrito o un vector descrito. Se pueden utilizar las células anfitrionas para producir los anticuerpos descritos o fragmentos de unión a antígeno.

30 Las células anfitrionas no se limitan a los hibridomas que producen un anticuerpo descrito, y pueden ser procarionas o eucariotas en las que se ha introducido un vector descrito. Cuando se utilizan eucariotas como células anfitrionas, por ejemplo, se pueden utilizar células animales, células vegetales, o células fúngicas. Las células animales incluyen células de mamíferos (CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945), COS, 3T3, mieloma, BHK (riñón de hámster bebé), células HeLa, Vero, etc.), células de anfibio (oocitos de Xenopus (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340), etc.), células de insecto (Sf9, SGI, Tn5, etc.). Como células vegetales, por ejemplo, se conocen las células derivadas de Nicotiana tabacum como un Sistema de expresión de proteína, y se pueden cultivar en el callo y utilizar. Las células fúngicas incluyen, por ejemplo, levadura (por ejemplo, del género Saccharomyces (Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces pombe, etc.), hongos filamentosos (por ejemplo, el género Aspergillus (Aspergillus niger, etc.). Las células procarionas incluyen, por ejemplo, E. coli y Bacillus. Los vectores se pueden introducir en células anfitrionas mediante métodos de fosfato de calcio, de métodos DEAE dextrano, métodos que utilizan DOTAP liposoma catiónico (Boehringer Mannheim), métodos de electroporación, métodos de lipofección, etc.

Adicionalmente, la descripción proporciona los anticuerpos producidos a partir de las células anfitrionas.

40 Adicionalmente, la descripción proporciona composiciones que comprenden el anticuerpo mencionado anteriormente de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se describe adelante, la descripción sugiere fuertemente que los siguientes anticuerpos son candidatos prometedores para los anticuerpos terapéuticos para prevenir fenotipos similares a Alzheimer:

45 los anticuerpos IR-003, IR-091, IR-099 (para el uso de acuerdo con la presente invención), IR-103, IR-130, y IR-148. Se ha mostrado que el deterioro de la memoria está relacionado con la disfunción sináptica provocada por oligómeros solubles beta A (Klein WL, 2001, Trends Neurosci; y Selkoe DJ, 2002, Science). La acumulación y depósito excesivo de los oligómeros beta A puede desencadenar la cascada en dirección 3' complicadas que provocan la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, la intervención terapéutica utilizando una composición que comprende un anticuerpo descrito, o fragmento de unión a antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable
50 podría ser efectiva para bloquear las cascadas patológicas, y por lo tanto esto podría permitir el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (documentos WO2009/051220, WO2009/099176, US 12/533.294 y US 12/533.348).

El "tratamiento" o "prevención" de la presente invención no necesariamente tiene efectos terapéuticos o preventivos completos contra los órganos o tejidos que exhiben Síntomas de trastornos o enfermedades, pero pueden tener efectos parciales o efectos de supresión de la progresión de los Síntomas.

“Tratamiento de enfermedad de Alzheimer” en la presente invención significa la mejora o supresión de la progresión de un Síntoma de por lo menos un Síntoma que puede ser provocado por la enfermedad de Alzheimer, y los ejemplos incluyen mejora o supresión del deterioro cognitivo, mejora o supresión de formación de placa senil, mejora o supresión de disfunción sináptica y a reducción o supresión de acumulación de beta A en los tejidos del cerebro, sangre o similares. Aquí, “deterioro cognitivo” incluye, por ejemplo, deterioro de la memoria que incluyen deterioro de la memoria a largo plazo/corto plazo, deterioro de la memoria de reconocimiento de objeto, deterioro de la memoria espacial y deterioro de la memoria asociativo y emocional. Aquí, “prevención de enfermedad de Alzheimer” significa la supresión de por lo menos un síntoma que puede ser provocada por la enfermedad de Alzheimer, e incluye supresión del desarrollo del deterioro cognitivo, supresión de la formación de placa senil, supresión del desarrollo de disfunción sináptica, supresión de acumulación de beta A en los tejidos del cerebro, sangre, o similar.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas o agentes farmacéuticos que comprenden como un ingrediente activo una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se especifica en las reivindicaciones y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer. Las composiciones farmacéuticas o agentes farmacéuticos anteriores se expresan como “composiciones farmacéuticas o agentes farmacéuticos que comprenden el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se especifica en las reivindicaciones como un ingrediente activo, y un portador farmacéuticamente aceptable”.

En la presente invención, la frase “que comprende como un ingrediente activo una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable”, y “que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como un ingrediente activo” significa que comprende una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se especifica en las reivindicaciones y un portador farmacéuticamente aceptable, o el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en las reivindicaciones como un ingrediente o componente principal que muestra actividad fisiológica o función farmacológica, pero no limita su índice de contenido.

Ejemplos de las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente incluyen agentes contra deterioro cognitivo, agentes terapéuticos para enfermedad de Alzheimer, agentes para suprimir el progreso de enfermedad de Alzheimer, agentes para suprimir formación de placa senil, agentes para suprimir acumulación de beta A, agentes antineurotóxicos (agentes para neutralizar neurotoxicidad), agentes para inhibir la formación de fibrilla amiloide beta A, y agentes de toxicidad anti-sináptica (agentes para neutralizar toxicidad sináptica).

Se puede expresar la composición farmacéutica mencionada anteriormente, por ejemplo, como “para uso en métodos para suprimir la enfermedad de Alzheimer” que comprende la etapa de administrar a un sujeto (individual) una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se especifica en las reivindicaciones y un portador farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, se puede expresar, por ejemplo, como “para uso en métodos para suprimir enfermedad de Alzheimer” que comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se especifica en las reivindicaciones. Adicionalmente los ejemplos incluyen métodos para suprimir el deterioro cognitivo, métodos para suprimir el progreso de enfermedad de Alzheimer, métodos para suprimir la formación de placa senil, métodos para suprimir la acumulación de beta A, métodos para neutralizar (suprimir) la actividad neurotóxica, métodos para inhibir la formación de fibrilla de amiloide beta A, y métodos para neutralizar (suprimir) la toxicidad sináptica. En los ejemplos adicionales se incluyen métodos para prevenir y/o tratar deterioro cognitivo, y métodos para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.

La descripción también proporciona el uso de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable para la fabricación de la composición farmacéutica mencionada anteriormente. La descripción proporciona adicionalmente el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para la fabricación de la composición farmacéutica descrita anteriormente.

Adicionalmente, la descripción divulga los siguientes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno.

- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para uso en prevenir y/o tratar deterioro cognitivo.

- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para uso en prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.

- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para uso en suprimir el progreso de enfermedad de Alzheimer.

- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para uso en suprimir formación de placa senil.
- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para uso en suprimir acumulación de beta A.
- 5 - El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para uso en neutralizar (suprimir) la actividad neurotóxica.
- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente en la invención para uso en inhibir la formación de fibrilla amiloide beta A.
- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para uso en neutralizar (suprimir) la toxicidad sináptica.
- 10 La descripción también se relaciona con los siguientes:
 - Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para prevenir y/o tratar deterioro cognitivo.
 - Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.
- 15 - Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para suprimir el progreso de enfermedad de Alzheimer.
- Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para suprimir formación de placa senil.
- Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para uso en suprimir acumulación de beta A.
- 20 - Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para neutralizar (suprimir) neurotoxicidad. Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente de la presente invención para inhibir la formación de fibrilla amiloide beta A.
- Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente de la presente invención para neutralizar (suprimir) la toxicidad sináptica.
- 25 Las composiciones farmacéuticas o agentes mencionados anteriormente se pueden administrar a humanos u otros animales. En la presente invención, los animales no humanos en los que se administran las composiciones o agentes farmacéuticos incluyen ratones, ratas, cobayas, conejos, gallinas, gatos, perros, ovejas, cerdos, vacas, monos, babuinos y chimpancés. Estos animales exhiben preferiblemente por lo menos un síntoma seleccionado de, por ejemplo, deterioro cognitivo, formación de placa senil, disfunción sináptica, acumulación beta A en los tejidos del
- 30 cerebro o sangre, etc.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno contenidos en las composiciones farmacéuticas no se limitan particularmente siempre que se incluyen en los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno, y ejemplos incluyen los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos aquí.

- 35 Al utilizar los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno para las composiciones farmacéuticas, se pueden formular por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, según sea necesario, se pueden preparar en forma de soluciones o suspensiones estériles inyectables con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable, y se pueden administrar por vía parenteral. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se incluyen en las composiciones farmacéuticas se pueden combinar con portadores o medios farmacéuticamente aceptables, específicamente, agua estéril, solución salina fisiológica,
- 40 aceites vegetales, emulsionantes, suspensiones, surfactantes, estabilizantes, agentes aromatizantes, excipientes, solventes, conservantes, aglutinantes, o similares, y se mezclan en una forma de dosis unitaria requerida para la práctica farmacéutica generalmente aceptada. La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia está inactiva, y contiene sustancias convencionales utilizadas como diluyentes o vehículos para los productos farmacéuticos. Los excipientes adecuados y sus formulaciones se describen, por ejemplo, en Remington's
- 45 Pharmaceutical Sciences, 16111 ed. (1980) Mack Publishing Co., ed. Oslo et al.

La solución salina fisiológica y otras Soluciones isotónicas que contienen glucosa o adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-mannosa, D-manitol, y cloruro de sodio) se pueden utilizar como Soluciones acuosas para inyección. Se

pueden utilizar junto con solubilizantes adecuados, tales como alcoholes, más específicamente, etanol y polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y surfactantes no iónicos (Polysorbate 80™, HCO-50, y similar).

5 Se puede utilizar aceite de sésamo o aceite de soja como un líquido oleaginoso, y se pueden utilizar benzoato de bencilo o alcohol bencílico en combinación como un solubilizante. Se pueden utilizar reguladores (por ejemplo, regulador de fosfato y regulador de acetato de sodio), agentes calmantes (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol), y antioxidantes para las formulaciones. Las Soluciones de inyección de preparados se pueden cargar en ampollas adecuadas.

10 La administración es preferiblemente administración parenteral, y los ejemplos específicos incluyen administración mediante inyección, administración transnasal, administración transpulmonar, y administración transdérmica. Ejemplos de administración por inyección incluyen la administración sistémica y local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, y similares.

15 Las composiciones farmacéuticas contienen una cantidad farmacéuticamente efectiva o cantidad terapéuticamente efectiva del componente activo (el anticuerpo mencionado anteriormente). "Cantidad farmacéuticamente efectiva (de un compuesto)" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para tratar y/o prevenir trastornos en los que los antígenos de los anticuerpos mencionados anteriormente cumplen una función importante. Por ejemplo, "una cantidad farmacéuticamente efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" puede ser una cantidad necesaria para reducir la acumulación beta A, neutralización de la toxicidad inducida por beta A, reducir la formación de fibrillas beta A, o similar, de ese modo tratar o prevenir afecciones provocadas por la enfermedad de
20 Alzheimer, cuando el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito anteriormente se administra a individuos (pacientes). La reducción o neutralización puede ser, por ejemplo, una reducción o neutralización de por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, o 100%.

25 La evaluación para determinar dicha cantidad farmacéuticamente efectiva de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno mencionados anteriormente se puede llevar a cabo utilizando un protocolo clínico Estándar que incluye el diagnóstico histopatológico.

Un método de administración adecuado se puede seleccionar dependiendo de la edad y los síntomas del paciente. La dosificación de una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo se puede seleccionar, por ejemplo, dentro del rango de 0.0001 mg a 1000 mg por kilogramo de peso corporal para cada administración. Alternativamente, por ejemplo, la dosificación para cada paciente se puede seleccionar dentro del rango de 0.001 a
30 100.000 mg/cuerpo; sin embargo, la dosis no se limita necesariamente a estos rangos. Aunque los métodos de dosificación y administración varían dependiendo del peso corporal del paciente, edad, síntomas, y similares, un experto en la técnica puede seleccionarlos de forma apropiada. La dosificación se puede seleccionar con base en la terapia de altas dosis de inmunoglobulina intravenosa (400 mg/kg) amparada por seguro de salud para humanos.

35 Las composiciones farmacéuticas o agentes que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se pueden incluir en los productos y kits que contienen materiales útiles para tratar afecciones patológicas de un sujeto. Los productos pueden comprender cualquier Recipiente marcado para un compuesto. Los recipientes adecuados incluyen botellas, frascos, y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales tales como vidrio y plástico. La marca en la superficie del Recipiente debe indicar que la composición se utiliza para tratar o prevenir una o más condiciones de la enfermedad. La marca también puede indicar las descripciones para la
40 administración, y similares.

Adicionalmente al recipiente mencionado anteriormente, un kit que contiene una composición farmacéutica o agente comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede incluir opcionalmente un segundo Recipiente que almacena un diluyente farmacéuticamente aceptable. El kit puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista de un usuario y comercial, que incluyen otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y
45 prospectos con las descripciones de uso.

Si es necesario, las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en un recipiente o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que comprenden un ingrediente activo. El paquete puede comprender lámina de metal o plástico, y, por ejemplo, es un paquete blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para administración.

50 En los agentes farmacéuticos y kits mencionados anteriormente, además del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente que es un ingrediente activo, se pueden mezclar según sea necesario agua estéril, solución salina fisiológica, aceites vegetales, agentes surfactantes, lípidos, agentes solubilizantes, reguladores, estabilizantes de proteínas (BSA, gelatina, etc.), conservantes, Soluciones de bloqueo, Soluciones de reacción, Soluciones de detección de reacción y reactivos para el tratamiento de muestras, y similares.

Adicionalmente, la descripción proporciona métodos para detectar oligómeros beta A (ejemplos incluyen beta40 A (beta 1-40 A), oligómeros beta42 A (beta 1-42 A), y beta40 oligómeros A/beta42 A) en muestras (especímenes). Ejemplos de "muestras" de la presente invención incluyen muestras recolectadas de individuos, sobrenadantes de cultivo de células, extractos celulares, muestras recolectadas de animales sujetos, o similar; sin embargo, no se limitan particularmente, siempre y cuando contengan oligómeros beta A. Específicamente, los presentes métodos incluyen la etapa de detectar oligómeros beta A contenidos en una muestra (por ejemplo, una muestra recolectada de un sujeto) utilizando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención. Los oligómeros beta A en una muestra se pueden detectar por métodos de detección inmunológica comunes, por ejemplo, utilizando ELISA (métodos de inmunoensayo enzimático en fase sólida de captura que utilizan quimioluminiscencia (ELISA con quimioluminiscencia), etc.), RIA, métodos de inmunoprecipitación que utilizan los anticuerpos obtenidos, inmunotransferencia, citometría de flujo, espectrometría de masas, y análisis inmunohistoquímico.

Cuando se detectan oligómeros beta A en una muestra recolectada de un sujeto mediante los métodos de medición mencionados anteriormente, el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer (documentos WO2009/051220, WO2009/099176, US 12/533.294 y US 12/533.348). De esta manera, la presente invención también proporciona métodos para diagnosticar si un sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, cuando la cantidad de oligómeros beta A en una muestra recolectada de un sujeto se compara con la de un individuo sano, y si la cantidad de oligómeros beta A es mayor en el sujeto que en el individuo sano, se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer. En general se diagnostica por los médicos si o no un sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer (que incluyen individuos bajo las instrucciones de los médicos; lo mismo que adelante). Los datos sobre la cantidad de oligómeros beta A en muestras recolectadas de un sujeto y un individuo sano, que se obtienen mediante los métodos actuales de diagnóstico, serán útiles para el diagnóstico de los médicos. Por lo tanto, los métodos actuales de diagnóstico se pueden expresar como métodos para recolectar y presentar datos útiles para el diagnóstico de los médicos. Adicionalmente, "un método para diagnosticar si un sujeto o no es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer" se expresa alternativamente como "un método para diagnosticar si un sujeto padece la enfermedad de Alzheimer, o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer".

Específicamente, la descripción proporciona métodos para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, en el que los procedimientos comprenden detectar oligómeros beta A en una muestra obtenida del sujeto utilizando un anticuerpo descrito anteriormente, o fragmento de unión a antígeno.

Más específicamente, la descripción proporciona un método para diagnosticar si un sujeto es o no un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra recolectada de un sujeto con el anticuerpo descrito anteriormente o fragmento de unión a antígeno de la presente invención; y

(b) medir la cantidad de oligómero beta A en la muestra,

en el que se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, cuando la cantidad medida en la etapa (b) es mayor que la de un individuo sano. La etapa (b) anterior se puede expresar alternativamente como "la etapa de detectar un oligómero beta A en la muestra a través del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención que se ha unido a un oligómero beta A en la muestra".

Adicionalmente, la descripción proporciona métodos para diagnosticar si un sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra recolectada de un sujeto con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a un monómero beta A; y

(b) medir la proporción de un oligómero beta A a un monómero beta A en la muestra, en el que se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer, si la relación medida en la etapa (b) es mayor que la de un individuo sano.

En primer lugar, en los métodos actuales, una muestra recolectada de un sujeto se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a un monómero beta A. En este documento, se puede llevar a cabo el "contacto", por ejemplo, mediante la adición de cada uno de los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno a una muestra recolectada de un sujeto, que se coloca en un tubo de ensayo. En este caso, se agrega el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno adecuadamente en forma de una solución, un sólido obtenido mediante secado por congelación, o tal. Cuando se agrega el anticuerpo como una solución acuosa, la solución puede puramente contener el anticuerpo solo, o puede contener, por ejemplo, surfactantes, excipientes, agentes colorantes, sabores, conservantes, estabilizantes, reguladores, agentes de suspensión, agentes de tonicidad, agentes aglutinantes,

disgregantes, lubricantes, promotores de fluidez, o correctores. La concentración a la que se agrega el anticuerpo no está particularmente limitada. Por ejemplo, en cuanto a las formulaciones de inmunoglobulina humana, las formulaciones liofilizadas de 500 mg, 1000 mg y 2500 mg y se pueden utilizar de forma adecuada. Se puede realizar "Contacto", por ejemplo, mediante la adición de una muestra a un portador en el que se ha inmovilizado el anticuerpo anterior o fragmento de unión a antígeno. Los ejemplos preferidos del portador sobre el que se ha inmovilizado el anticuerpo anterior o el fragmento de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, microplacas, perlas (perlas magnéticas, perlas de Sepharose, etc).

A continuación, se mide la relación de oligómero beta A a monómero beta A (en el presente documento, esto también se denomina como "índice de O/M") en la muestra mencionada. Para medir esta relación, la medición puede llevarse a cabo utilizando un método para comparar los valores ELISA de oligómero y monómero obtenidos a partir de la misma muestra.

Entonces, esta relación se compara con la relación de un individuo sano. Cuando la relación es mayor en el sujeto que en el individuo sano, se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer.

Los métodos de diagnóstico se pueden realizar tanto in vitro como in vivo, pero se realizan preferiblemente in vitro.

Preferiblemente, la "muestra recolectada de un sujeto" no se limita particularmente, siempre y cuando se trate de un tejido derivado de un sujeto. Los ejemplos incluyen el cerebro (parénquima cerebral, y demás), órganos y fluidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, y demás) de un sujeto. En la presente invención, la muestra es preferiblemente sangre (más preferiblemente, plasma) o líquido cefalorraquídeo. La "muestra recolectada de un sujeto" incluye una muestra tratada con una enzima, tratada utilizando una columna, tratada por centrifugación, tratada por extracción, después de recolección.

Cuando la muestra es un tejido cerebral, las muestras de tejido congelado del tejido cerebral se pueden homogeneizar y someter a ultracentrifugación o por ejemplo, para separar las fracciones solubles en regulador y las fracciones insolubles en regulador y medir los oligómeros beta A. Por ejemplo, se homogeniza un tejido cerebral en nueve volúmenes de solución salina Tris regulada (TS) que contiene un cóctel de inhibidores de proteasa, y los homogeneizados se ultracentrifugan a 265.000 x g durante 20 minutos. Entonces, un sobrenadante recolectado como una fracción soluble del tejido cerebral se puede utilizar como una muestra para inmunotransferencia, ELISA, RIA, inmunoprecipitación, etc. Se puede solubilizar una fracción insoluble en regulador mediante extracción de ácido fórmico (por ejemplo, 70%), y se utiliza como una muestra para inmunotransferencia, ELISA, RIA, inmunoprecipitación, etc. Los extractos de ácido fórmico pueden ser neutralizados o se diluyen con un regulador adecuado (por ejemplo, Tris-HCl 1M (pH 8,0)).

Cuando los oligómeros beta A presentes en el tejido cerebral se visualizan y se miden por métodos inmunohistoquímicos, las secciones de tejido cerebral de un sujeto se pueden utilizar como muestras. Para mejorar la inmunorreactividad, las secciones de tejido cerebral se pueden pre-tratar con proteasa K. En los métodos inmunohistoquímicos, no es esencial cuantificar oligómeros beta A en los tejidos cerebrales. Por ejemplo, si se observa una deposición beta A, se determina que el sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer.

Para aumentar la precisión de las mediciones de oligómeros beta A, se pueden eliminar las lipoproteínas de una muestra derivada de un sujeto. El agotamiento de las lipoproteínas se puede realizar mediante, por ejemplo, la combinación de ultracentrifugación, ultrafiltración y cromatografía de afinidad. Un método específico de agotamiento de lipoproteínas a partir de una muestra se ejemplifica a continuación, pero no se limita a los mismos.

La densidad de una muestra se ajusta a 1,25 g/ml con KBr. La muestra se ultracentrifugó a 100.000 rpm y 16 grados C durante ocho horas. Las lipoproteínas flotan a una densidad de 1,25 g/ml y fluido aclarado agotado de lipoproteína se someten a ultrafiltración utilizando una membrana de corte de 3 kDa (Microcon 3; Amicon, Inc), y después se congelan y se almacenan, o se almacenan a 4 grados C, hasta uso. Las lipoproteínas también se eliminan por cromatografía de afinidad utilizando PHML-LIPOSORB (Calbiochem, La Jolla, CA). Una muestra y PHML-LIPOSORB (Calbiochem, La Jolla, CA) se combinan en una proporción de 1,5:1, y se mezclaron durante 60 segundos. Después, la mezcla se centrifuga a 3000 rpm durante diez minutos. Los sobrenadantes resultantes se pueden utilizar como muestras libres de lipoproteínas. Las muestras unidas a lipoproteínas unidas a PHML-LIPOSORB se eluyen utilizando 20 mM de desoxicolato de sodio. La eliminación de las lipoproteínas específicas se puede confirmar mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguido por tinción con FAST-RED 7B (Wako, Osaka, Japón).

Adicionalmente, por el tamaño de fraccionamiento de oligómeros beta A en una muestra, utilizando cromatografía de exclusión de tamaño, ultrafiltración, o demás, y la posterior detección de oligómeros beta A en cada fracción utilizando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la presente invención, se puede medir la cantidad de oligómeros beta A de cada tamaño en la muestra. El fraccionamiento por cromatografía de exclusión de tamaño se puede realizar mediante la concentración de una muestra derivada de un sujeto de aproximadamente

diez veces utilizando un filtro de corte Microcon de peso molecular 3 kDa (Millipore Corp.), y después aplicar la muestra a una columna de exclusión de tamaño Superose 12 (1 cm x 30 cm; Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia; tasa de 0,5 ml/min de caudal) equilibrada con un regulador de fosfato. Alternativamente, el fraccionamiento por ultrafiltración se puede llevar a cabo mediante ultrafiltración secuencial utilizando membranas de corte Microcon de 3 kDa, 10 kDa, 30 kDa, y 100 kDa. La cantidad de oligómero beta A contenida en cada fracción se puede medir mediante ELISA, RIA, inmunotransferencia, inmunoprecipitación, etc.

Los métodos de medición de un oligómero beta A no están particularmente limitados, siempre que comprendan la etapa de detectar un oligómero beta A en una muestra utilizando los anticuerpos descritos anteriormente o fragmentos de unión a antígeno. Métodos preferibles incluyen ELISA de captura. Cuando se lleva a cabo ELISA de captura, el fragmento de unión a antígeno o anticuerpo descrito anteriormente, se puede inmovilizar o marcar. Alternativamente, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente se puede utilizar como un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario marcado se pueden unir al mismo. El otro anticuerpo utilizado en el ELISA de captura puede ser un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente, o puede ser un anticuerpo beta anti A disponible comercialmente. Un método específico de detección de oligómeros beta A en una muestra mediante ELISA de captura se ejemplifica a continuación, pero no se limita a los mismos.

Las microplacas se recubren con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente, y se agregan 100 micro 1 de una muestra y se incubó de forma continua durante 24 horas a 4 grados C. A continuación, el fragmento Fab' BA27 conjugado con peroxidasa de rábano (beta 1-40 anti-A específico para beta 40 A Wako pure chemical, Osaka, Japón) o fragmento Fab' BC05 conjugado con peroxidasa de rábano (beta 35-43 anti-A específica para beta 42 A; Wako pure chemical, Osaka, Japón) se agrega y se incuba a 4 grados C durante 24 horas. La quimioluminiscencia generada utilizando Substrato quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) se cuantifica mediante un Luminómetro de Microplacas Veritas (Promega).

Adicionalmente, si una muestra se inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo descrito anteriormente, y luego se realizó análisis de inmunotransferencia, el tamaño del oligómero beta A contenido en una muestra se puede identificar sin necesidad de llevar a cabo el fraccionamiento por tamaño mediante cromatografía de exclusión de tamaño, ultrafiltración, o similares. A continuación se ejemplifica un método específico, pero no se limitada a los mismos.

La inmunoprecipitación se llevó a cabo mediante la incubación de una muestra con un anticuerpo descrito anteriormente y Proteína G Sepharosa. Los oligómeros beta A inmunoprecipitados se separan utilizando un gel Bis-Tris-Glicina NuPAGE al 4-12% y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa o Immobilon P (Millipore) utilizando ácido 3-ciclohexilamino-1-propano sulfónico 10 mM (pH 11) que contiene metanol al 10% en 400 mA durante una hora. Se bloquearon sitios de unión no específicos en la membrana con un regulador de fosfato que contiene leche baja en grasa al 5%, BSA al 1%, y Tween-20 al 0,05% a temperatura ambiente durante tres horas. Se detectan oligómeros beta A mediante reacción con un anticuerpo descrito, o un anticuerpo beta anti A comercialmente disponible tal como 4G8 o 6E10 (Covance Immuno-Technologies, Dedham, MA).

Adicionalmente, para cuantificar la cantidad de un oligómero beta A en una muestra, se puede preparar una curva de calibración utilizando muestras Estándar que contiene una concentración conocida de un oligómero beta A. Se pueden utilizar oligómeros beta A para la preparación de muestras Estándar al diluir un beta A sintético (forma HCl) disuelto en una solución de HCl con PBS o similar a una concentración adecuada (por ejemplo, 0,1 mg/ml), e incubar a 37 grados C durante una hora. Se puede seleccionar adecuadamente la temperatura de incubación y el tiempo para beta A sintético. En los métodos de diagnóstico descritos, para obtener la relación de un oligómero beta a monómero beta, también se puede preparar una curva de calibración para monómeros beta A. Se pueden preparar monómeros beta A utilizados para la preparación de muestras de monómeros beta A estándar diluyendo un beta A sintético (forma TFA) disuelto en TFA (ácido trifluoroacético) con PBS o similar a una concentración adecuada (por ejemplo, 0,1 mg/ml). Para beta A sintético, se puede utilizar beta 1-40 A, beta 1-42 A, o similar.

Adicionalmente, la descripción proporciona agentes (reactivos) o kits para uso en los métodos mencionados anteriormente de la medición de una oligómeros beta en una muestra, o métodos de diagnóstico de si un sujeto es posible paciente con enfermedad de Alzheimer.

Los agentes para uso en los métodos mencionados anteriormente para la medición de oligómeros beta A en una muestra, o métodos de diagnóstico de si un sujeto es posible paciente con enfermedad de Alzheimer incluyen agentes que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente. Preferiblemente, los agentes incluyen soluciones de anticuerpos y anticuerpos inmovilizados; sin embargo, no se limitan a los mismos. Cuando los agentes se encuentran en una forma de solución de anticuerpo, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente se disuelve en un disolvente adecuado. Los expertos en la técnica pueden seleccionar disolventes adecuados para disolver el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente, tal como agua, solución salina fisiológica, regulador de fosfato, regulador Tris, etc. La anterior solución de anticuerpo puede comprender, además de un anticuerpo descrito anteriormente, un regulador, agente

estabilizante de proteínas, agente conservante, agente de bloqueo, surfactante, agente de solubilización, u otros, según sea necesario.

5 Cuando el agente es un anticuerpo inmovilizado, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente está siendo llevado por un vehículo adecuado. Ejemplos de vehículo incluyen microplacas, perlas (perlas magnéticas, perlas de Sepharose, etc.), membranas de nitrocelulosa, y demás; sin embargo, no se limitan a los mismos. Expertos en la técnica pueden seleccionar portadores adecuados para inmovilizar los anticuerpos descritos. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describió anteriormente se pueden enlazar a los portadores utilizando métodos conocidos.

10 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describió anteriormente comprendidos en los agentes se pueden marcar adecuadamente con un marcador enzimático, marcador radiactivo, marcador fluorescente, marcador de tinte, marcador de luminiscencia química, etc.

15 Los kits para uso en los métodos de medición de oligómeros beta A mencionados anteriormente, o métodos para diagnosticar sí o no un sujeto es un posible paciente con enfermedad de Alzheimer incluyen los kits que comprenden agentes que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente. Ejemplos preferibles de agentes que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente son como se mencionaron anteriormente. Los kits pueden comprender un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente en forma de polvo liofilizado. En este caso, los usuarios del kit de disolver el polvo liofilizado de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con un disolvente adecuado. Los kits pueden comprender un disolvente para disolver el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Los kits pueden comprender adicionalmente
20 una solución de dilución para diluir las soluciones de anticuerpos mencionados anteriormente.

25 Los kits pueden comprender, además de un agente que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente, reactivo tal como agente de bloqueo, reactivo cromogénico, sustrato cromogénico, solución de terminación de reacción, solución de lavado, regulador, anticuerpo primario, anticuerpo secundario, u otros, según sea necesario. Los expertos en la técnica pueden seleccionar un reactivo adecuado dependiendo del método de medición de oligómero A beta. Por ejemplo, un kit ELISA de captura que comprende una microplaca sobre la cual se inmoviliza el anticuerpo puede comprender adicionalmente un anticuerpo beta anti A marcado, sustrato cromogénico, solución de terminación de reacción, solución de lavado, junta de placa, etc. Adicionalmente, en un kit ELISA de captura que comprende una solución de anticuerpo descrita anteriormente puede comprender
30 adicionalmente una microplaca en la que se inmoviliza un anticuerpo beta anti A, sustrato cromogénico, la solución de terminación de reacción, solución de lavado, sello de placa, anticuerpo secundario marcado (si el anticuerpo descrito no está marcado), etc.

35 Los kits pueden comprender adicionalmente una muestra estándar para la preparación de una curva de calibración de oligómero beta A. La muestra estándar puede ser una solución que contiene una concentración conocida de un oligómero beta. Los kits pueden comprender una solución de dilución para la dilución por etapas de la solución Estándar. Alternativamente, se puede incluir polvo liofilizado de oligómeros beta A, y puede estar compuesto de un disolvente para disolver el polvo liofilizado. Adicionalmente, los kits pueden comprender una solución o polvo liofilizado de un monómero beta A, y los usos del kit pueden preparar una solución Estándar de oligómero beta mediante la incubación de la solución de monómero beta A para polimerizar monómeros beta A.

40 Cuando los kits son para su uso en métodos de diagnóstico de si un sujeto es posible paciente con enfermedad de Alzheimer, pueden comprender una muestra (un tejido cerebral, fluido cerebroespinal, sangre, plasma, etc.) recolectados de un individuo sano como control negativo, y una muestra recolectada de un paciente con AD de cerebro como control positivo.

45 El kit puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo reguladores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y documentos adjuntos que incluyen descripciones de uso (instrucciones, CD-ROM, etc.). Estos agentes y dichos contenidos en el kit se pueden incluir en un Recipiente con una etiqueta. Dicho Contenedor incluye una botella, frasco, tubo de ensayo, microtubo, etc.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe específicamente con referencia a los Ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

50 Métodos de Preparación de antígenos

Un colorante fluorescente, 6-carboxitetrametilrodamina (6-TAMRA) (SIGMA) está ligado químicamente a la terminal N de un péptido sintético beta 1-40 A (Peptide Institute, Inc.) para producir un a beta A modificada. Se prepara una

muestra rica en oligómeros (oligómero beta 1-40 A) al copolimerizar el péptido beta A modificado y péptido beta sintético 1-40 A. Es preferible ajustar las condiciones para que la intensidad de fluorescencia determinada por ensayo ThT (Yamamoto N, et al: J Biol Chem, 282: 2646-2655, 2007), que se describe a continuación, sea un cuarto o menos de la intensidad de fluorescencia en ausencia de una beta A modificada. Más específicamente, se prefiere que se mezcle cada 100 micro M de péptidos modificados beta A y sintéticos beta 1-40 A, y se polimeriza durante 20 horas.

Preparación de hibridomas que producen anticuerpos

Se inmunizaron ratones BALB/c mediante inyección del antígeno preparado mediante el método descrito anteriormente en sus almohadillas de las patas o cavidades abdominales. A continuación, se llevó a cabo seis veces la inmunización de refuerzo. Se preparan hibridomas a partir de células de ganglios linfáticos inguinales o células de bazo mediante fusión con células Sp2/0-Agl4 utilizando polietilenglicol 1500.

ELISA de cribado (cribado primario)

Se agregaron sobrenadantes de cultivo de hibridoma a las placas ELISA inmovilizadas con oligómeros beta A y se hacen reaccionar. El desarrollo de color se llevó a cabo utilizando solución TMB y anticuerpo IgG anti ratón conjugado con HRP. Oligómeros beta A utilizados en este método es beta 1-40 A (forma HCl) después de una hora de incubación o más antígenos extraídos descritos de tetrámero beta 1-42 A.

Análisis de transferencia Dot (cribado secundario)

El análisis de transferencia Dot se llevó a cabo para los hibridomas que dieron resultado positivo para el cribado primario. En este análisis, 0.1 micro g/dot de los tres tipos de beta A; beta 1-40 A sintetizado (forma TFA) como un monómero beta, beta 1-40 A sintetizado (forma HCl) después de 1 hora de incubación como oligómero beta A y beta 1-42 A sintetizado, se inmovilizaron sobre una membrana de nitrocelulosa y se utilizaron. La membrana se bloqueó con regulador Tris que contiene leche baja en grasa al 5% y Tween-20 al 0.05%, y se hace reaccionar con sobrenadantes de cultivo de hibridoma y se detectaron utilizando un anticuerpo IgG de ratón anti conjugado con HRP -y un kit de quimioluminiscencia (ECL).

Isotipificación de anticuerpos

Se lleva a cabo isotipificación de inmunoglobulinas purificadas utilizando un Kit De Prueba De Isotipificación De Anticuerpos Monoclonales De Ratón Serotec (Oxford, RU).

Identificación de secuencias de anticuerpos

Se purificó ARN de hibridomas (1×10^6 células) producidas por el método descrito anteriormente utilizando el Kit de ARN FastPure (Takara, Japón). Utilizando ARN como plantillas, se sintetizó cADN utilizando el Sistema 5' RACE (Invitrogen, EE.UU.) y cebadores específicos para cadenas H o cadenas L de anticuerpos que se producen de cada hibridoma. Las secuencias cebadoras del lado 3' que se utilizaron para síntesis de cADN se muestran adelante.

mIGC1Rv (G1) de cadena H: AAGGCTTACAACCACAATCCCT (SEQ ID NO: 131)

mIGC2aRv (G2a) de cadena H: TGCTGGGCATTTGCATGGA (SEQ ID NO: 132)

35 mIGC2bRv (G2b) de cadena H: TGGGCATTTGTGACTCC (SEQ ID NO: 133)

mIGC3Rv (G3) de cadena H: ACTGGGCTTGGGTATTCTAGG (SEQ ID NO: 134)

mIKCNRv1 (kappa) de cadena L: GTCCAAGTTCAGGACGCCATTTTGTGCGT (SEQ ID NO: 135)

mILCNRv1 (lambda) de cadena L: TCCACAGTGTGACCTTCATGAGTGACC (SEQ ID NO: 136)

Adicionalmente, utilizando el cADN se amplificaron las regiones VH y VL mediante el método PCR. Adelante se muestran las secuencias de cebador 3'específicas para las cadenas H o cadenas L utilizadas para PCR.

40 MIGCNRv de cadena H: ACAGGGATCCAGAGTTCCA (SEQ ID NO: 137)

mIKCNRv2 (kappa) de cadena L: TAACTGCTCACTGGATGG (SEQ ID NO: 138)

mILCNrV2 (lambda) de cadena L: AGTGTGGCCTTGTTAGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 139)

Se lleva a cabo síntesis de cADN y PCR de acuerdo con el manual adjunto al producto, y los cebadores unidos al producto (AAP):

5 GGCCACGCGTCTCGACTAG-TACGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 140), AUAP: GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC (SEQ ID NO: 141)) se utilizaron como cebadores laterales 5'. Se utilizó polimerasa de ADN Taq de Alta Fidelidad (Invitrogen, EE.UU.) para PCR.

10 Fragmentos de región VH y VL amplificados por PCR fueron ligados con el vector lineal (pGEMTM-T Easy Vector (Promega, EE.UU.)) durante una hora y se transformaron en la cepa alfa DH5 E. coli. Se cultivaron durante la noche colonias formadas un medio de selección de líquido y los plásmidos se purificaron utilizando el High Purity Plasmid Miniprep System (Marigén Biosciences, EE.UU.). Se determinaron secuencias de anticuerpo mediante análisis de secuencias de genes utilizando el Kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) y el Analizador de ADN 3730x1 (Applied Biosystems). Se utilizaron dos cebadores descritos delante para análisis de secuencias.

15 SP6: CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC (SEQ ID NO: 142) M13Rv: TCACACAGGAAACAGCTATGAC (SEQ ID NO: 143)

Anticuerpos de control

20 Se utilizó 6E10 de anticuerpo beta anti A como un anticuerpo de control para comparar con los anticuerpos descritos. 6E10 de anticuerpo beta anti A (Covance Immuno-Technologies, Dedham, MA) es un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce una secuencia en beta 1-16 A como un epítipo, y no tiene selectividad contra un oligómero beta A (se une a un monómero beta A).

ELISA Competitivo

25 Se preparan antígenos de oligómeros beta A al diluir beta 1-40 A sintético (forma HCl) a 0.1 mg/ml con PBS e incubación a 37 grados °C durante una hora. Se preparó un monómero beta al diluir beta 1-40 A sintético (forma TFA) a 0.1 mg/ml con PBS. En primer lugar, 400 ng/pozo del oligómero beta A se inmovilizan sobre inmunoplasmas de 96 pozos y la placa se bloquea con BSA. A continuación, los anticuerpos descritos o un anticuerpo (6E10) beta anti A de control se mezclaron cada uno con un oligómero beta A o onomero beta A diluido en serie en un rango de 100 pg/ml a 100 micro g/ml y se incubaron durante dos horas, a continuación, se agregó una inmunoplasma de 96 pozos y se incubó a temperatura ambiente durante diez minutos. Se detectaron las capacidades de unión de cada uno de los anticuerpos al oligómero beta A inmovilizado al reaccionar con anticuerpo IgG anti de ratón conjugado con HRP y visualizado al medir la absorbancia en 450 nm utilizando solución TMB. En el método actual, dos tipos beta 1-40 A (monómero beta 1-40 A y oligómero beta 1-40 A), que tienen la misma secuencia, pero tienen diferentes características de polimerización y estructura debido a su estructura, se compararon como sustancias competitivas. De acuerdo con lo anterior, el método puede comparar la diferencia de unión de los anticuerpos solamente derivados de la existencia de polimerización beta 1-40 A, y de esta manera se puede obtener resultados extremadamente confiables.

Análisis de afinidad al oligómero beta A

40 Se llevó a cabo análisis por resonancia de plasmón de superficie (SPR) utilizando Biacore 3000 (GE Healthcare Sciences). Se inmovilizó un oligómero beta A sobre un chip sensor (CM5) como un ligando y los anticuerpos descritos y anticuerpo de control 6E10 se utilizaron como analito, se llevó a cabo análisis de cinética. Se realizó el análisis de anticuerpos de analitos en las siguientes cinco concentraciones: 1.25, 2.50, 5.00, 10.00, y 20.00 micro g/ml, y se calcularon la constante de velocidad de asociación (ka), constante de velocidad de disociación (kd) y constante de disociación (KD) utilizando el Softearw BIAevaluation. Se preparó un oligómero beta A utilizado en el análisis al diluir beta 1-40 A sintético (forma de HCl) a 0.1 mg/ml con PBS e incubando a 37 grados °C durante una hora.

45 Ensayo de neurotoxicidad inducida por beta A

50 Células humanas de neuroblastoma (células SH-SY5Y) fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 150,000 células/poro, y se cultivaron durante 24 horas en DMEM que contiene FBS al 10%. Luego, el medio fue reemplazado con un medio libre de suero que contiene 12.5 micro M de beta 1-42 A en presencia o ausencia de anticuerpos y se cultivaron las células durante otras 24 horas. Para determinar la citotoxicidad inducida por beta 1-42 A, se determinaron los contenidos LDH, liberados en el medio a partir de células muertas utilizando el Kit CytoTox96 (fabricado por Promega).

La actividad de supresión de la formación de fibrillas amiloides beta A

5 Una solución beta 1-42 A diluida a 12.5 micro M con medio de cultivo celular se incubó en presencia o ausencia de los anticuerpos descritos a 37 grados °C durante 24 horas. Luego, se mezclaron las soluciones con Solución de Tioflavina T (ThT) (5 micro M ThT, 50 mM de glicina-NaOH, pH 8.5), la intensidad de fluorescencia ThT, que se correlaciona con contenidos de fibrillas amiloides beta A se determinó utilizando espectrofotómetro de fluorescencia (RF -5300PC; Shimadzu Co., Kyoto, Japón). Se fijaron las longitudes de onda de excitación y emisión en 446 nm y 490 nm, respectivamente. La intensidad de fluorescencia se midió inmediatamente después que se preparó la mezcla.

Inmunotransferencia

10 Se utilizaron homogeneizados de cerebro de Tg2576 o ratones tipo silvestre para ensayo de unión APP. Los homogeneizados se sometieron a electroforesis en gel al 4-12% de Tris-Glicina NuPAGE y se transfirieron a una membrana PVDF. Se hizo reaccionar la membrana a cada anticuerpo después de bloquear por reactivo de bloqueo PVDF (TOYOBO). Se detectó la capacidad de unión mediante un anticuerpo IgG anti ratón conjugado con HRP y un reactivo quimioluminiscente (Immobilon western, Millipore).

15 Resultado

Selección de anticuerpos de oligómero beta anti A

20 Se inmunizaron 46 ratones con antígeno oligómero beta 1-40 A y se aisló el bazo o ganglio linfático inguinal de cada ratón. Se fusionaron células derivadas de cada uno de los órganos con mieloma (Sp2/0-Ag14) y se suministraron en siete placas de placas de 96 pozos cada una por ratón y se cultivaron. Se seleccionaron los hibridomas que producen los anticuerpos de interés al agregar el sobrenadante de cultivo de las placas de 96 pozos en placas de ELISA inmovilizadas con un oligómero beta A, y haciéndolas reaccionar para analizar. Como resultado, se seleccionan 507 células positivas de 30,912 pozos ((46 ratones) x (7 placas) x (96 pozos)).

25 El cribado ELISA descrito anteriormente también selecciona anticuerpos que no se unen específicamente al oligómero beta A (anticuerpos que se unen a la placa ELISA diferente el oligómero beta A). Al realizar el análisis de transferencia dot, se pueden excluir estos anticuerpos no específicos. De acuerdo con lo anterior, se realiza análisis de transferencia dot utilizando células positivas para ELISA.

30 Para análisis de transferencia dot, dos tipos de oligómeros y un monómero beta A fueron detectados y se excluyeron anticuerpos no específicos (se excluyeron anticuerpos anticuerpos que no se unen al oligómero beta A descubierto), así como se confirmó la especificidad contra el oligómero beta A (ausencia de unión al monómero beta A). Como resultado, se seleccionaron 6 anticuerpos positivos entre 507 células positivas para ELISA (figura 1).

Identificación de secuencias de anticuerpos

35 Las secuencias de región variable se analizaron por el método mencionado anteriormente, para 6 anticuerpos (es decir, EL IR- 003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, y IR-148) seleccionados por el análisis de transferencia dot anterior. Como resultado, se obtuvieron las siguientes secuencias de nucleótidos de regiones que comprenden VH CDR1, CDR2, y CDR3: SEQ ID NO: 1(IR-003), SEQ ID NO: 17(IR-091), SEQ ID NO: 33(IR-099), SEQ ID NO: 49(IR-103), SEQ ID NO: 65(IR-130), y SEQ ID NO: 81(IR- 148). A partir de la anterior secuencia de nucleótidos, se obtuvieron las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 2(IR-003), SEQ ID NO: 18(IR-091), SEQ ID NO: 34(IR-099), SEQ ID NO: 50(IR-103), SEQ ID NO: 66(IR-130), y SEQ ID NO: 82(IR-148).

40 Adicionalmente, se obtuvieron las siguientes secuencias de nucleótidos de regiones que comprenden VL CDR1, CDR2, y CDR3:

45 SEQ ID NO: 3(IR-003), SEQ ID NO: 19(IR-091), SEQ ID NO: 35(IR-099), SEQ ID NO: 51(IR-103), SEQ ID NO: 67(IR-130), y SEQ ID NO: 83(IR-148). A partir de la anterior secuencia de nucleótidos, se obtuvieron las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 4(IR-003), SEQ ID NO: 20(IR-091), SEQ ID NO: 36(IR-099), SEQ ID NO: 52(IR-103), SEQ ID NO: 68(IR-130), y SEQ ID NO: 84(IR-148). [0204] Las secuencias de CDR se determinaron de las secuencias de aminoácidos, con base en la definición por Kabat (Kabat, Elvin A., Sequences of proteins of immunological interest 5th ed., National Institutes of Health, 1991). Las secuencias de CDR de los anticuerpos se muestran en la Tabla 1. En la Tabla 1, el "Nombre" muestra el nombre de cada anticuerpo, "clase" muestra la subclase IgG de cada anticuerpo, "cadena " muestra si la cadena es una cadena H o L, y "(na)" significa "ácido nucleico".

TABLA 1

Nombre	Clase	Cadena	CDR1	SEQ ID NO (na)	CDR2	SEQ ID NO	SEQ ID NO (na)	CDR3	SEQ ID NO	SEQ ID NO (na)
IR-003	2b	H	TSG MGV S	5	HIYWDDDKRYNPSLKS	8	7	RGEVRRRRGYAMDY	10	9
		L	RSS QS LVHS NGN TYLH	11	KVSNRFS	14	13	SQSTHVPLT	16	15
IR-091	2b	H	TSG MGV G	21	HIWWDDDKYINPSLKS	24	23	RGLRRGDYFDY	26	25
		L	RSS QSIV HSN GNT YLE	27	KVSNRFS	30	29	FQGSHVPLT	32	31
IR-099	1	H	RF GMIH	37	YI SSGRSTIYYADTVKG	40	39	GGGNYVGAMDY	42	41
		L	RSS QSLE NSN GNT VLN	43	RVSNRFS	46	45	LQVTHVPPT	48	47

IR-103	2b	H	SFG MH	54	53	YISSGSSTIYYADTVKG	56	55	SPLLRLQGLAY	58	57
		L	RSS QSIV HSN GNT YLE	60	59	KVSNRFS	62	61	FIGSHVPPT	64	63
IR-130	2a	H	DYY MY	70	69	YISNGGGSTIYPDVTYKG	72	71	GTSYGSSSLHYIYAMDY	74	73
		L	RSS QSLV HSN GNT YLH	76	75	KVSNRFS	78	77	SQSTHVPLT	80	79
IR-148	2a	H	SFG MH	86	85	YISSGSSTIYYADTVKG	88	87	DYYGMDY	90	89
		L	RSS QSLV HSN GNT YLH	92	91	KVSNRFS	94	93	SQSTHVPLT	96	95

Algunas de las secuencias de VH y VL obtenidas contenían péptidos de señal o carecían de secuencias de terminal N o terminal C. Si se carece de secuencias, se complementan.

De este modo, las secuencias VH y VL sin secuencias de señal se determinaron con base en la homología con las secuencias de anticuerpos previamente reportadas.

- 5 Las secuencias de aminoácidos de VH y VL, que excluyen los péptidos de señal, de cada anticuerpo se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Nombre	Cadena	Región variable	SEQ ID NO	SEQ ID NO (na)
IR-003	H	QVTLKESGPGILQFSDTLSTLCSFSGFSLSTSGMGSWTRDPSGKGLEWLAHLIYWDQDKRYNP SLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYCARREVRRRGYAMDYWGQGTSTVYSS	98	97
	L	DVYMTQTPLSLPVLGDAQSISCRSSQSLVHSMGNTYLNHYLQRPQQSPKLLIYKYSNRFSGY PDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYFCQSGTHVPLTFGAGTKLELK	100	99
IR-091	H	QVTLKESGPGILQFSDTLSTLCSFSGFSLSTSGMGSWTRDPSGKGLEWLAHLIYWDQDKRYNP SLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYCARREVRRRGYAMDYWGQGTSTVYSS	102	101
	L	DVLMITQTLPLSLPVLGDAQSISCRSSQSLVHSMGNTYLNHYLQRPQQSPKLLIYKYSNRFSGY PDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYFCQSGTHVPLTFGAGTKLELK	104	103
IR-099	H	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSKASGFTFSRFQMHWRDAPKLEWYAYISSGRSTIYYADT VKGRFTIIRDNPKNITLFLQMTSLRSEDTAMYYCARGGNYYGMDYWGQGTSTVYSS	106	105
	L	DAVMTQTPLSLPVLGDAQSISCRSSQSLVHSMGNTYLNHYLQRPQQSPKLLIYKYSNRFSGY LDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYFCQSGTHVPLTFGAGTKLEIK	108	107
IR-103	H	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSKASGFTFSRFQMHWRDAPKLEWYAYISSGRSTIYYADT VKGRFTIIRDNPKNITLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSPLRLQGLAYWGQGTSTVYSA	110	109
	L	DVLMITQTLPLSLPVLGDAQSISCRSSQSLVHSMGNTYLNHYLQRPQQSPKLLIYKYSNRFSGY PDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYFCQSGTHVPLTFGAGTKLEIK	112	111
IR-130	H	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKASGFTFSDYVMYWRDTPKLEWYAYISMGGGSTIYDPT VKGRFTIIRDNPKNITLFLQMSRLKSEDTAMYYCARGTSYGSLSLHYAMDYWGQGTSTVYSS	114	113
	L	DVYMTQTPLSLPVLGDAQSISCRSSQSLVHSMGNTYLNHYLQRPQQSPKLLIYKYSNRFSGY PDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYFCQSGTHVPLTFGAGTKLELK	116	115
IR-148	H	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSKASGFTFSRFQMHWRDAPKLEWYAYISSGRSTIYYADT VKGRFTIIRDNPKNITLFLQMTSLRSEDTAMYYCARDYYGMDYWGQGTSTVYSS	118	117
	L	DVYMTQTPLSLPVLGDAQSISCRSSQSLVHSMGNTYLNHYLQRPQQSPKLLIYKYSNRFSGY PDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYFCQSGTHVPLTFGAGTKLELK	120	119

Las secuencias de aminoácidos de péptidos de señal de cadena H de cada anticuerpo se muestran en los siguientes números ID de secuencia:

5 SEQ ID NO: 122(IR-003), SEQ ID NO: 124(IR-091), SEQ ID NO: 126(IR-099, IR-103, y IR-148), SEQ ID NO: 128(IR-130). Las secuencias de nucleótidos que codifican péptidos de señal de cadena H de cada anticuerpo se muestran en los siguientes números ID de secuencia:

SEQ ID NO: 121(IR-003), SEQ ID NO: 123(IR-091), SEQ ID NO: 125(IR-099, IR-103, y IR-148), SEQ ID NO: 127(IR-130).

Las secuencias de aminoácidos de péptidos de señal de cadena L de cada anticuerpo se muestran en los siguientes números ID de secuencia:

10 SEQ ID NO: 130(IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, y IR-148). Las secuencias de nucleótidos que codifican péptidos de señal de cadena L de cada anticuerpo se muestran en los siguientes números ID de secuencia:

SEQ ID NO: 129(IR-003, IR-091, IR-099, IR-103, IR-130, y IR-148).

Análisis ELISA competitivo

15 El análisis de transferencia Dot es un método para analizar una reactividad contra el monómero u oligómero beta A inmovilizado sobre una membrana de nitrocelulosa. Sin embargo, los betas A se solubilizan en fluidos tales como el líquido intersticial, fluido cerebral o sangre. Luego, el presente análisis se llevó a cabo para investigar la unión específica a oligómeros beta A en Soluciones y la diferencia de selectividad para el monómero beta A. El ELISA de competición es un método para determinar la especificidad del oligómero al hacerlo reaccionar preliminarmente con anticuerpos que van a medir y diluir en serie el monómero u oligómero beta A en Soluciones, y llevar a cabo ELISA al
 20 agregar las Soluciones a una placa inmovilizada con oligómero beta A. Cuando un anticuerpo es un anticuerpo específico a oligómero beta A, la reacción de ELISA disminuye de una manera dependiente de la concentración del oligómero beta A en una solución que reacciona con un oligómero beta, pero no disminuye en una solución que reacciona con el monómero beta A o disminuye cuando la concentración de beta A se vuelve mayor que la concentración del oligómero. Los seis anticuerpos anteriores se analizaron y se obtuvo el resultado mostrado en la
 25 Figura 2. Todos los anticuerpos mostraron una alta especificidad de unión incluso en la solución. Mientras tanto, el anticuerpo que reacciona con el monómero y oligómero beta A(6E10) utilizado como un control mostraron reactividad de ELISA equivalente contra el monómero y oligómero. Adicionalmente, los resultados de ELISA de competición en los que se muestra la concentración del inhibidor como concentración molar se muestran en la
 30 Figura 3. La IC₅₀ y la selectividad del oligómero beta A sobre el monómero beta A (IC₅₀ de monómero beta A / IC₅₀ de oligómero beta A) calculada por el ELISA de competición en la Figura 3 se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Nombre del Anticuerpo	IC ₅₀ nmol/L)		Selectividad (vs monómero)
	Monómero	Oligómero	
IR-003	>2200	18.5	>118.9
IR-091	>2200	2.54	>866.1
IR-099	>2200	11.6	>189.7
IR-103	>2200	7.5	>293.3
IR-130	>2200	10.7	>205.6
IR-148	>2200	4.04	>544.6
Control (6E10)	6.84	7.58	0.9

Análisis de afinidad para el oligómero beta A

Para investigar la capacidad de unión de los anticuerpos descritos para el oligómero beta A, se analizó la afinidad (véase Métodos). Los seis anticuerpos se analizaron y se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 4. La constante de índice de asociación calculada (k_a), constante de índice de disociación (k_d) y constante de disociación (KD) se muestran en la Tabla 4.

5

TABLA 4

Nombre del Anticuerpo	Ensayo cinético		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$KD=k_d/k_a$ (M)
IR-003	9.48E+04	2.32E-03	2.45E-08
IR-091	2.55E+05	1.88E-03	7.37E-09
IR-099	2.71E+05	2.52E-03	9.30E-09
IR-103	1.30E+05	5.71 E-03	4.39E-08
IR-130	1.65E+05	0.11	6.67E-07
IR-148	2.41 E+04	9.31E-04	3.86E-08
6E10	5.78E+04	1.68E-04	2.91E-09

Ensayo de la capacidad de neutralización de los anticuerpos de oligómeros beta anti-a contra citotoxicidad inducida por beta A

10 Los oligómeros beta A provocan citotoxicidad a las células neuronales. Para evaluar si los anticuerpos de oligómeros beta anti-A neutralizan la citotoxicidad inducida por beta A, se realizó ensayo in vitro utilizando células de neuroblastoma humano (células SH-SY5Y). La mayoría de los anticuerpos mostraron la capacidad de neutralización contra citotoxicidad inducida por beta A. Ejemplos de anticuerpos que muestran la capacidad de neutralización se muestran en la Figura 5. En los gráficos, el valor del eje Y indica el índice relativo de citotoxicidad de solo beta A (sin anticuerpo).

15 Ensayo de capacidad de inhibición de los anticuerpos de oligómeros beta anti-A contra una formación de fibrillas beta A

20 Los monómeros beta A forma fibrillas como resultado de multimerización cuando se incuban en un regulador de pH neutro. Para evaluar si los anticuerpos inhiben la formación de fibrillas, un anticuerpo y beta A se mezclaron y se incubaron durante 24 horas y la mezcla se midió mediante fluorescencia de tioflavina T, que refleja la cantidad de fibrillas. La mayoría de los anticuerpos mostraron la capacidad de inhibición contra formación de fibrillas beta. Ejemplos de anticuerpos que muestran la capacidad de inhibición se muestran en la Figura 6. En el gráfico, el valor de eje Y indica el índice relativo a la formación de fibrillas de solo beta A (sin anticuerpo).

Inmunotransferencia para confirmar que los anticuerpos de oligómeros beta anti-A no se unen a APP (proteína precursora amiloide)

25 Es importante para el escape de efectos secundarios que los anticuerpos beta anti-A no se unan a APP que es la proteína fisiológica expresada en un cuerpo sano. Se espera que los anticuerpos de oligómeros beta anti-A no se unan a APP porque reconocen el dominio conformacional del oligómero beta A que no está presente en la APP. Por lo tanto, se realizó inmunotransferencia para evaluar si los anticuerpos de oligómeros beta anti-A descritos no se unen a la APP. Se confirmó que no se unen a la APP humana (en comparación con el resultado del anticuerpo 6E10 de control). Ejemplos de análisis de inmunotransferencia se muestran en la Figura 7. Estos datos también muestran que los anticuerpos descritos tienen una baja afinidad de unión a proteínas diferentes del oligómero beta A, y la especificidad de los anticuerpos es alta (en comparación con el resultado del anticuerpo 6E10 de control).

30

Aplicabilidad industrial

Se espera que los anticuerpos proporcionados por la presente invención contribuyan al establecimiento de métodos preventivos/terapéuticos selectivos para moléculas responsables de provocar afecciones patológicas de la enfermedad de Alzheimer.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> IMMUNAS PHARMA, INC.
 <120> Anticuerpos que se unen específicamente a oligómeros beta a y uso de los mismos
 <130> M7-A0902P2
 <150> US 61/231,797
 <151> 2009-08-06
- 10 <150> US 61/282,550
 <151> 2010-02-26
 <160> 143
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
- 15 <211> 429
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 1
- | | |
|--|-----|
| atgaacaggc ttacttcctc attgctgctg ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtcccag | 60 |
| gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact | 120 |
| tgttctttct ctgggttttc actgagcact tctggtatgg gtgtgagctg gattcgtcag | 180 |
| ccttcaggaa agggctctgga gtggctggca cacatttact gggatgatga caagcgctat | 240 |
| aaccatccc tgaagagccg gctcacaatc tccaaggata cctccagcaa tcaggtattc | 300 |
| ctcaagatca ccagtgtgga cactgcagat actgccacat attactgtgc tcgaagaggg | 360 |
| gaggtgcgac gtcggggtta ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc | 420 |
| gtctcctca | 429 |
- 20 <210> 2
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
 85 90 95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Glu Val Arg Arg Arg Gly Tyr Tyr
 115 120 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 3

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 3

ES 2 614 949 T3

atgacccaaa ctccactctc cctgcctgtc agtcttggag atcaagcctc catctcttgc 60
 agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaacacct atttacattg gtacctgcag 120
 aagccaggcc agtctccaaa gctcctgata taciaagttt ccaaccgatt ttctggggtc 180
 ccagacaggt tcagtggcag tggatcaggg acagatttca cactcaagat cagcagagtg 240
 gaggctgagg atctgggagt ttatttctgc tctcaaagta cacatgttcc gctcacgttc 300
 ggtgctggga ccaagctgga gctgaaa 327

<210> 4

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

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

<210> 5

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 5

acttctggta tgggtgtgag c 21

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 6

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
1 5

<210> 7

<211> 48

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 7

cacatttact gggatgatga caagcgctat aacctatccc tgaagagc 48

<210> 8

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

20 <210> 9

<211> 42

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 9

25 agaggggagg tgcgacgtcg gggttactat gctatggact ac 42

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Arg Gly Glu Val Arg Arg Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

10

<210> 11

<211> 48

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 11

agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttaccat 48

<210> 12

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

15 <210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 13

20 aaagttcca accgatttc t 21

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 14

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 15

5 tctcaaagta cacatgttcc gctcacg 27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <400> 16

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 17

<211> 420

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 17

atggacaggc ttacttcttc attcctgctg ctgattgtcc ctgcatatgt cttgtcccaa	60
gttactctaa aagagtctgg ccctgggata ttgaagccct cacagaccct cagtctgact	120
tgttctttct ctgggttttc actgagcact tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag	180
ccttcagggga agggctctgga gtggctggca cacatttggg gggatgatga taagtactat	240
aaccatccc tgaagagcca gtcacaatc tccaaggata cctccagaaa ccaggtattc	300
ctcaagatca ccagtgtgga cactgcagat actgccactt actactgtgc tcgaagagga	360
ttacgacgag gggactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca	420

<210> 18

<211> 140

20 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

ES 2 614 949 T3

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
85 90 95

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Phe Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 19

<211> 327

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 19

atgacccaaa ctccactctc cctgcctgtc agtcttggag atcaagcctc catctcttgc 60
agatctagtc agagcattgt acatagtaat ggaaacacct atttagaatg gtacctgcaa 120
aaaccaggcc agtctccaaa gctcctgata tacaagttt ccaaccgatt ttctggggtc 180
ccagacaggt tcagtggcag tggatcaggg acagatttca cactcaagat cagcagagtg 240
gaggctgagg atctgggagt ttattactgc tttcaagggt cacatgttcc gctcacgttc 300
ggtgctggga ccaagctgga gctgaaa 327

ES 2 614 949 T3

<210> 20

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 20

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

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn
20 25 30

Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
35 40 45

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

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val
85 90 95

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 21

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 21

acttctggta tgggtgtagg c 21

<210> 22

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 23

5 <211> 48

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 23

cacatttggg gggatgatga taagtactat aacctatccc tgaagagc 48

10 <210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

15 **His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser**
1 5 10 15

<210> 25

<211> 33

<212> ADN

<213> Mus musculus

20 <400> 25

agaggattac gacgagggga ctacttgac tac 33

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<400> 26

Arg Gly Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 27

<211> 48

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 27

5 agatctagtc agagcattgt acatagtaat ggaaacacct atttagaa 48

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <400> 28

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

<210> 29

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 29

aaagttcca accgatttc t 21

<210> 30

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 31

25 <211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 31

tttcaaggtt cacatgttcc gctcacg 27

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 32

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 33

<211> 417

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 33

```
atggactcca ggctcaattt agttttcctt gtccttattt taaaagggtg ccagtgtgat      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaggggcccg gaaactctcc      120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagttagg tttggaatgc actgggttcg tcaggctcca      180
gagaaggggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggca gaagtacat ctactatgca      240
gacacagtga agggccgatt caccatctcc agagacaatc ccaagaacac cctgttcctg      300
caaatgacca gtctaaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag aggggggggt      360
aactacgttg gggctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctectca      417
```

<210> 34

<211> 139

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Arg Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Gly Asn Tyr Val Gly Ala Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 35

<211> 327

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 35

ES 2 614 949 T3

atgacccaaa ctccactctc cctgcctgtc agtcttgag atcaagcctc catctcttgc 60
 aggtctagtc agagccttga aaacagtaat ggaaacacct atttgaactg gtacctccag 120
 aaaccaggcc agtctccaca gctcctgatc tacagggttt ccaaccgatt ttctggggtc 180
 ctagacaggt tcagtggtag tggatcaggg acagatttca cactgaaaat cagcagagtg 240
 gaggctgagg atttgggagt ttatttctgc ctccaagtta cacatgtccc tccgacgttc 300
 ggtggaggca ccaagctgga aatcaaaa 327

<210> 36

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 36

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

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn
 20 25 30

Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val Thr His Val
 85 90 95

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 37

<211> 15

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 37

aggtttggaa tgcac 15

<210> 38

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Arg Phe Gly Met His
1 5

<210> 39

10 <211> 51

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 39

tacattagta gtggcagaag taccatctac tatgcagaca cagtgaaggg c 51

15 <210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

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

20 **Gly**

<210> 41

<211> 33

<212> ADN

<213> Mus musculus

25 <400> 41

ggggggggta actacgttgg ggctatggac tac 33

<210> 42

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 47

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 47

ctccaagtta cacatgtccc tccgacg 27

<210> 48

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Leu Gln Val Thr His Val Pro Pro Thr

1

5

<210> 49

15 <211> 417

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 49

atggactcca	ggctcaattt	agttttcctt	gtccttattt	taaaagggtgt	ccagtgtgat	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggctta	gtgcagcctg	gagggtcccg	gaaactctcc	120
tgtgcagcct	ctggattcac	tttcagtagc	tttggaatgc	actgggttcg	tcaggctcca	180
gagaaggggc	tggagtgggt	cgcatacatt	agtagtggca	gtagtaccat	ctactatgca	240
gacacagtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatc	ccaagaacac	cctgttcctg	300
caaatgacca	gtctaaggtc	tgaggacacg	gccatgtatt	actgtgcaag	atccccatta	360
ctacggctac	agggacttgc	ttactggggc	caagggactc	tggtcactgt	ctctgca	417

20 <210> 50

<211> 139

ES 2 614 949 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Leu Leu Arg Leu Gln Gly Leu Ala Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135

5 <210> 51

<211> 327

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 51

ES 2 614 949 T3

atgacccaaa ctccactctc cctgcctgtc agtcttggag atcaagcctc catctcttgc 60
 agatctagtc agagcattgt acatagtaat ggaaacacct atttagaatg gtacctgcag 120
 aaaccaggcc agtctccaaa gctcctgata taaaagttt ccaaccgatt ttctggggtc 180
 ccagacaggt tcagtggcag tggatcaggg acagatttca cactcaagat cagcagagtg 240
 gaggtgagg atctgggagt ttattactgc tttcaagggt cacatgttcc tccgacgttc 300
 ggtggaggca ccaagctgga aatcaaa 327

<210> 52

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 52

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

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn
 20 25 30

Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
 35 40 45

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

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val
 85 90 95

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 53

10 <211> 15

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 53

agctttggaa tgcac 15

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 54

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 55

<211> 51

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 55

tacattagta gtggcagtag taccatctac tatgcagaca cagtgaaggg c 51

<210> 56

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

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

Gly

20 <210> 57

<211> 33

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 57

25 tccccattac tacggctaca gggacttgct tac 33

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

Ser Pro Leu Leu Arg Leu Gln Gly Leu Ala Tyr
1 5 10

5 <210> 59

<211> 48

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 59

10 agatctagtc agagcattgt acatagtaat ggaaacacct atttagaa 48

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 60

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

<210> 61

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Mus musculus

<400> 61

aaagttcca accgatttc t 21

<210> 62

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 63

<211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

5 <400> 63

tttcaagggt cacatgttcc tccgacg 27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 64

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 65

<211> 429

15 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 65

atgaacttgg	ggctcagctt	gattttcctt	gtccttgttt	taaaagggtgt	ccagtgtgaa	60
gtgaagctgg	tggagtctgg	gggaggctta	gtgcagcctg	gaggggccct	gaaactctcc	120
tgtgcaacct	ctggattcac	tttcagtgac	tattacatgt	attgggttcg	ccagactcca	180
gagaagaggg	tggagtgggt	cgcatacatt	agtaatggtg	gtggtagcac	ctattatcca	240
gacactgtaa	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatg	ccaagaacac	cctgtacctg	300
caaatgagcc	gtctgaagtc	tgaggacaca	gccatgtatt	actgtgcaag	agggacctca	360
tacggtagta	gccttcatta	ctatgctatg	gactactggg	gtcaaggaac	ctcagtcacc	420
gtctcctca						429

<210> 66

20 <211> 143

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

ES 2 614 949 T3

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ser Tyr Gly Ser Ser Leu His Tyr Tyr
115 120 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 67

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 67

atgaccctaaa ctccactctc cctgcctgtc agtcttggag atcaagcctc catctcttgc 60
agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttacattg gtacctgcag 120
aagccaggcc agtctccaaa gctcctgata taaaagttt ccaaccgatt ttctggggtc 180
ccagacaggt tcagtggcag tggatcaggg acagatttca cactcaagat cagcagagtg 240
gaggctgagg atctgggagt ttatttctgc tctcaaagta cacatgttcc gctcacgttc 300
ggctgctggga ccaagctgga gctgaaa 327

ES 2 614 949 T3

<210> 68

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 68

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

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn
20 25 30

Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
35 40 45

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

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val
85 90 95

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 69

<211> 15

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 69

gactattaca tgtat 15

<210> 70

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Asp Tyr Tyr Met Tyr
1 5

210> 71

5 <211> 51

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 71

tacattagta atgggtggg tagcacctat tatccagaca ctgtaaaggg c 51

10 <210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

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

15 **Gly**

<210> 73

<211> 45

<212> ADN

<213> Mus musculus

20 <400> 73

gggacctcat acggtagtag ccttcattac tatgctatgg actac 45

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<400> 74

Gly Thr Ser Tyr Gly Ser Ser Leu His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

ES 2 614 949 T3

<210> 75

<211> 48

<212> ADN

<213> Mus musculus

5 <400> 75

agatctagtc agagcctgt acacagtaat ggaaacacct attacat 48

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 76

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

<210> 77

<211> 21

15 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 77

aaagttcca accgatttc t 21

<210> 78

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

25 <210> 79

<211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 79

tctcaaagta cacatgttcc gctcacg 27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 80

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 81

<211> 405

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 81

atggactcca ggctcaattt agttttcctt gtccttattt taaaagggtg ccagtgtgat	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaggggcccg gaaactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tttggaatgc actgggttcg tcaggctcca	180
gagaaggggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggca gtagtaccat ctactatgca	240
gacacagtga agggccgatt caccatctcc agagacaatc ccaagaacac cctgttctcg	300
caaatgacca gtctaaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag agattactac	360
ggtatggact actggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca	405

<210> 82

15 <211> 135

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

ES 2 614 949 T3

Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 83

<211> 327

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 83

ES 2 614 949 T3

atgacccaaa ctccactctc cctgcctgtc agtcttggag atcaagcctc catctcttgc 60
 agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttacattg gtacctgcag 120
 aagccaggcc agtctccaaa gctcctgata taaaaagttt ccaaccgatt ttctggggtc 180
 ccagacaggt tcagtggcag tggatcaggg acagatttca cactcaagat cagcagagtg 240
 gaggctgagg atctgggagt ttatttctgc tctcaaagta cacatgttcc gctcacgttc 300
 ggtgctggga ccaagctgga gctgaaa 327

<210> 84

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 84

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

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn
 20 25 30

Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
 35 40 45

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

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val
 85 90 95

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 85

<211> 15

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 85

agctttggaa tgcac 15

<210> 86

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 86

Ser Phe Gly Met His
1 5

10 <210> 87

<211> 51

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 87

15 tacattagta gtggcagtag taccatctac tatgcagaca cagtgaaggg c 51

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 88

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

Gly

<210> 89

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Mus musculus

<400> 89

gattactacg gtatggacta c 21

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 90

Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5

<210> 91

<211> 48

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 91

agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttaccat 48

<210> 92

<211> 16

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

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

<210> 93

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 93

aaagttcca accgatttc t 21

25 <210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 94

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 95

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 95

tctcaaagta cacatgttcc gctcacg 27

<210> 96

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 97

15 <211> 372

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 97

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtcg	60
acttgttcct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt	120
cagccttcag gaaaggtct ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc	180
tataaccat cctgaagag cggctcaca atctccaagg atacctcag caatcaggt	240
ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catattactg tgctcgaaga	300
ggggaggtgc gacgtcgggg ttactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc	360
accgtctcct ca	372

20 <210> 98

<211> 124

<212> PRT

ES 2 614 949 T3

gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 100

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 100

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 101

<211> 363

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 101

ES 2 614 949 T3

caagttactc taaaagagtc tggccctggg atattgaagc cctcacagac cctcagtctg 60
acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120
cagccttcag ggaagggctt ggagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180
tataacccat ccctgaagag ccagctcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggta 240
ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca cttactactg tgctcgaaga 300
ggattacgac gaggggacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360
tca 363

<210> 102

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 102

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gly Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 614 949 T3

<210> 103

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

5 <400> 103

```

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaaa aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagattcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggffc acatgttccg      300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa                                336
    
```

<210> 104

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 104

```

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
                35                    40                45

Pro Lys 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 Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                85                    90                95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
                100                   105                110
    
```

ES 2 614 949 T3

<210> 105

<211> 360

<212> ADN

<213> Mus musculus

5 <400> 105

gatgtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cgggaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aggtttggaa tgcaactgggt tcgtcaggct	120
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatcac attagtagtg gcagaagtac catctactat	180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgttc	240
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagagggggg	300
ggtaactacg ttggggctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca	360

<210> 106

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 106

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Gly Asn Tyr Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 107

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 107

gatgctgtga tgaccctaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca ggtctagtca gaggcttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120
 tacctccaga aaccaggcca gtctccacag ctctgatct acagggtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcagga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tatttctgcc tccaagttac acatgtcctt 300
 ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 108

ES 2 614 949 T3

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 108

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu
 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 85 90 95

5 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 109

<211> 360

<212> ADN

<213> Mus musculus

10 <400> 109

ES 2 614 949 T3

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcaactgggt tcgtcaggct 120
 ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg gcagtagtac catctactat 180
 gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240
 ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagatcccca 300
 ttactacggc tacagggact tgcttactgg ggccaagga ctctggtcac tgtctctgca 360

<210> 110

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 110

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Arg Leu Gln Gly Leu Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 111

ES 2 614 949 T3

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 111

```

gatgttttga tgaccctaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttctt      300
5  ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa                                336

```

<210> 112

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <400> 112

```

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro Lys 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 Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

ES 2 614 949 T3

<210> 113

<211> 372

<212> ADN

<213> Mus musculus

5 <400> 113

```

gaagtgaagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tcctgtgcaa cctctggatt cactttcagt gactattaca tgtattgggt tcgccagact      120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatac attagtaatg gtggtggtag cacctattat      180
ccagacactg taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac      240
ctgcaaatga gccgtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagggacc      300
tcatacggta gtagccttca ttactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc      360
accgtctcct ca                                                                372

```

<210> 114

<211> 124

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 114

```

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

```

ES 2 614 949 T3

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Ser Tyr Gly Ser Ser Leu His Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 115

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 115

gatgttgatga tgacccaaac tccactotcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 116

<211> 112

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 614 949 T3

<400> 116

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

<210> 117

<211> 348

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 117

gatgtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgcagc	ctggagggtc	ccgaaactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactttcagt	agctttggaa	tgcactgggt	tcgtcaggct	120
ccagagaagg	ggctggagtg	ggtcgcatac	attagtagtg	gcagtagtac	catctactat	180
gcagacacag	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	atcccaagaa	caccctgttc	240
ctgcaaatga	ccagtctaag	gtctgaggac	acggccatgt	attactgtgc	aagagattac	300
tacggtatgg	actactgggg	tcaaggaacc	tcagtcaccg	tctcctca		348

<210> 118

10 <211> 116

<212> PRT

ES 2 614 949 T3

<213> Mus musculus

<400> 118

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 119

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 119

gatggttgga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

10

ES 2 614 949 T3

<210> 120

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 120

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 121

<211> 57

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 121

atgaacaggc ttaactcctc attgctgctg ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtcc 57

<210> 122

<211> 19

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 614 949 T3

<400> 122

Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 123

<211> 57

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 123

atggacaggc ttactcttc attcctgctg ctgattgtcc ctgcatatgt cttgtcc 57

<210> 124

10 <211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 124

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15

Val Leu Ser

15 <210> 125

<211> 57

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 125

20 atggactcca ggctcaatt agtttcctt gtccttatt taaaagggtg ccagtg 57

<210> 126

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 126

Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 127

<211> 57

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 127

atgaactgg ggctcagct gatttcctt gtccttggtt taaaagggtg ccagtg 57

<210> 128

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 128

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 129

15 <211> 57

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 129

atgaagtgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagt 57

20 <210> 130

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 130

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser

<210> 131

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador

<400> 131

aaggcttaca accacaatcc ct 22

10 <210> 132

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> una secuencia de cebador

<400> 132

tgctgggcat ttgcatgga 19

<210> 133

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador

<400> 133

25 tgggcatttg tgacactcc 19

<210> 134

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador

<400> 134

5 actgggcttg ggtattctag g 21

<210> 135

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> una secuencia de cebador

<400> 135

gtccaactgt tcaggacgcc atttgtcgt t 31

<210> 136

15 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador

20 <400> 136

tccacagtgt gacctcatg agtgacc 27

<210> 137

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador

<400> 137

acagggatcc agagttcca 19

30 <210> 138

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> una secuencia de cebador

<400> 138

taactgctca ctggatgg 18

<210> 139

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador

<400> 139

15 agtgtggcct tgtagtctc gagc 24

<210> 140

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> una secuencia de cebador

<400> 140

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg 30

<210> 141

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador

30 <400> 141

ggccacgcgt cgactagtac 20

<210> 142

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> una secuencia de cebador

<400> 142

cgccagggtt ttccagtca cgac 24

10 <210> 143

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> una secuencia de cebador

<400> 143

tcacacagga aacagctatg ac 22

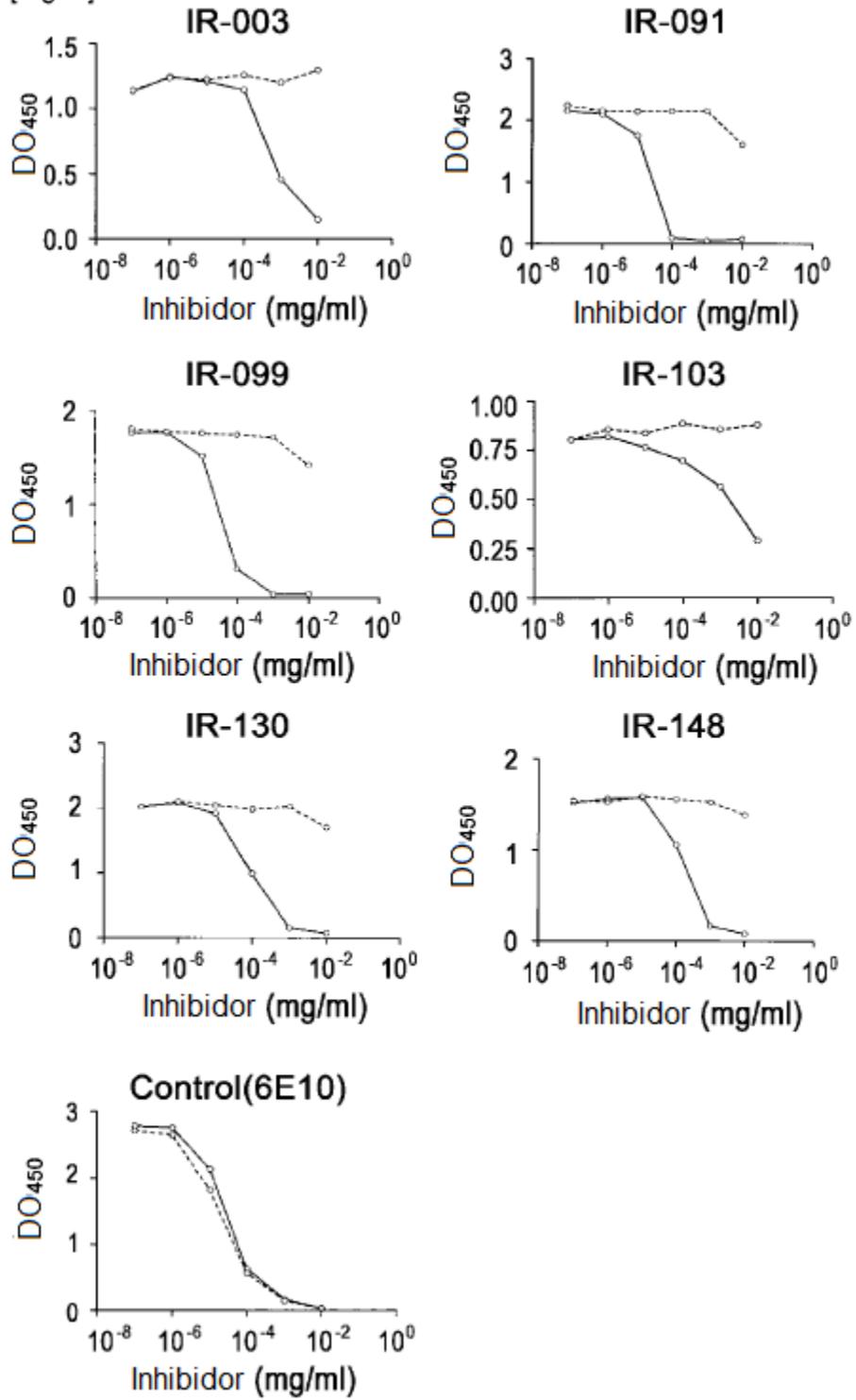
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce un oligómero beta A aislado como un antígeno, en el que el anticuerpo no se une a un monómero beta A y comprende
- 5 (a) una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 como CDR3; y
(b) una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 como CDR1, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46 como CDR2, y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 como CDR3, para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106 como VH; y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 108 como VL.
- 15 3. El anticuerpo para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
4. Una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un portador farmacéuticamente aceptable.

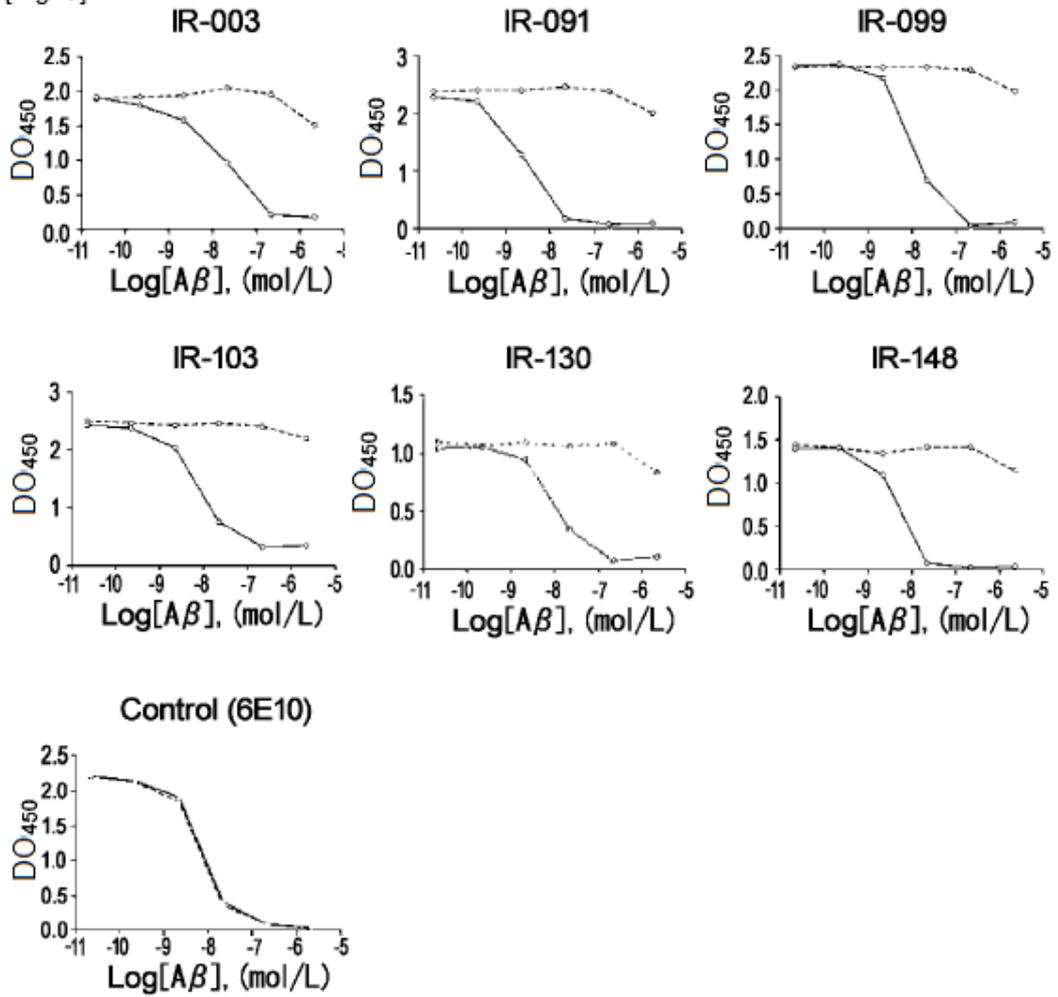
[Fig. 1]

	<u>Aβ40</u>		Aβ42	
	0	1	1	h
IR-003				
IR-091				
IR-099				
IR-103				
IR-130				
IR-148				

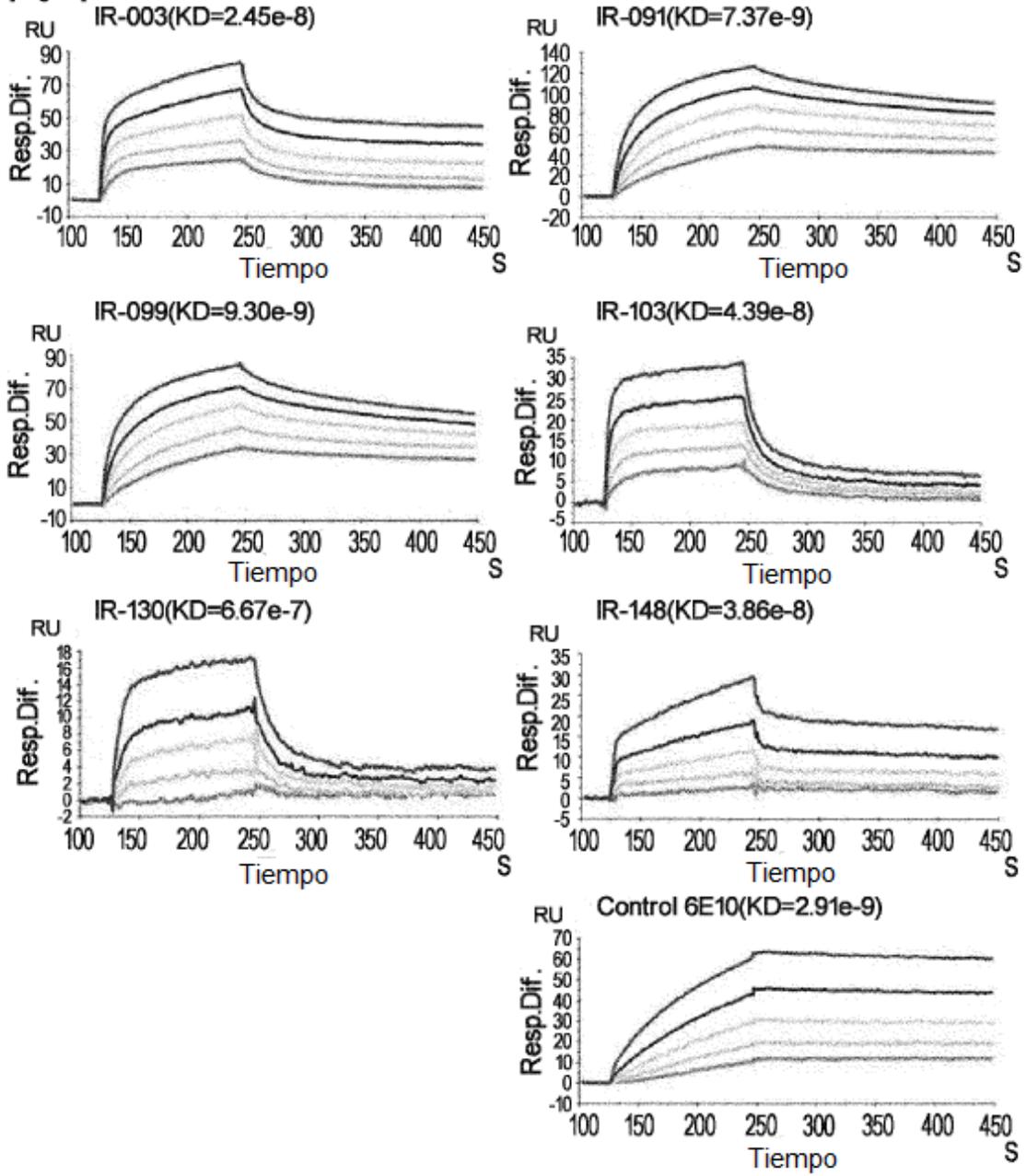
[Fig. 2]



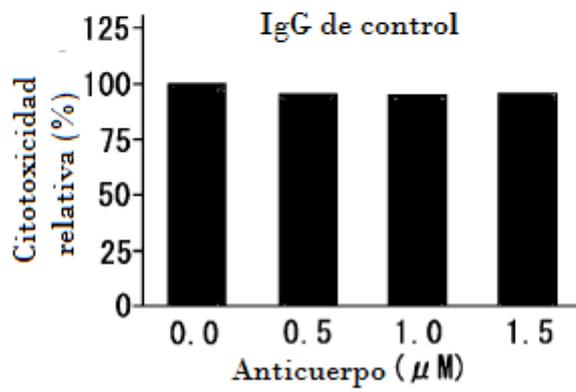
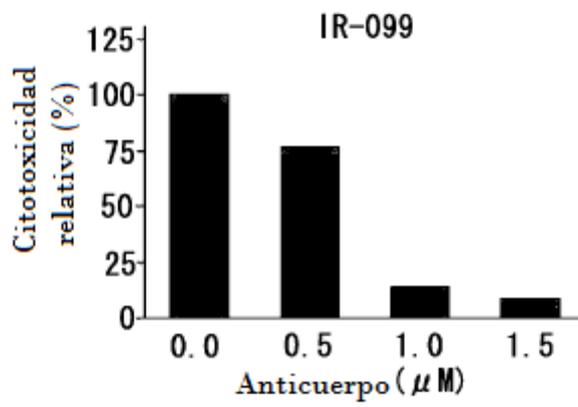
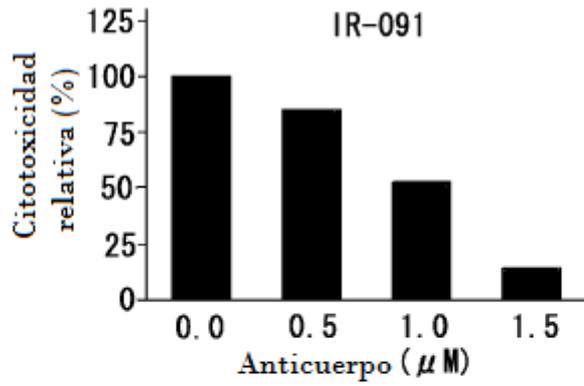
[Fig. 3]

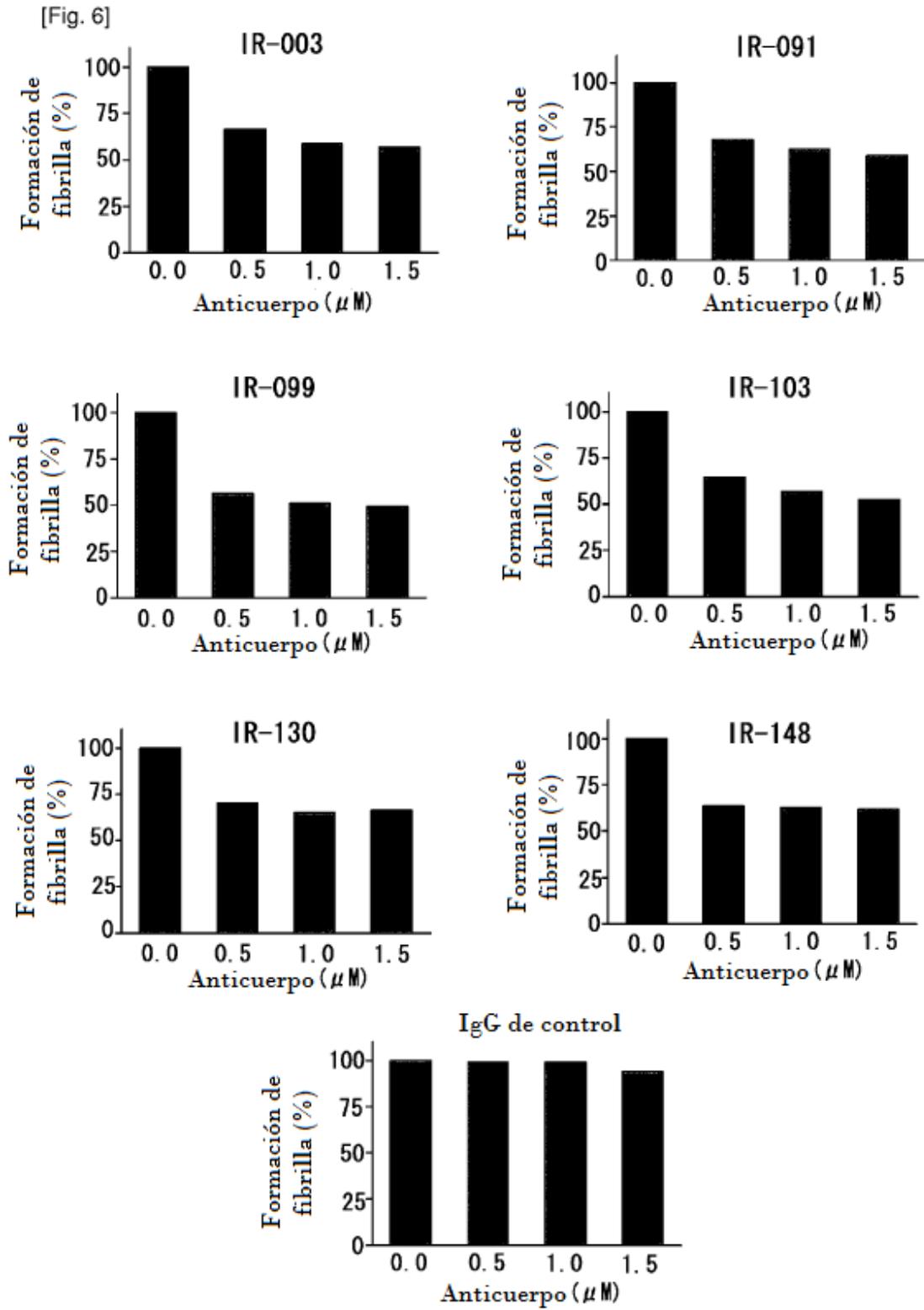


[Fig. 4]



[Fig. 5]





[Fig. 7]

