

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 317**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2008 E 11185486 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2436696**

54 Título: **Anticuerpo anti-beta-amiloide y sus usos**

30 Prioridad:

05.01.2007 US 878831 P

11.06.2007 US 934291 P

05.01.2007 EP 07000211

17.10.2007 EP 07020341

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

03.10.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF ZURICH (100.0%)

Rämistr. 71

8006 Zurich, CH

72 Inventor/es:

NITSCH, ROGER, PROF. DR.;

HOCK, CHRISTOPH, PROF.;

ESSLINGER, CHRISTOPH, DR.;

KNOBLOCH, MARLEN;

TISSOT, KATHRIN y

GRIMM, JAN, DR.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 635 317 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

Anticuerpo anti-beta-amiloide y sus usos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas moléculas de unión específicas, particularmente anticuerpos humanos, así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos que reconocen epítomos asociados con enfermedades, incluyendo neoepítomos, de proteínas que derivan de proteínas nativas endógenas, y que son predominantes en el cuerpo de un paciente en una forma variante y/o fuera de su contexto fisiológico normal. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas de unión, anticuerpos y miméticos de los mismos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis y patología beta-amiloide.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

El éxito de la generación de anticuerpos monoclonales se basa en la fusión eficiente y selectiva de células B estimuladas por antígeno con una línea celular de mieloma murina, seguida de la selección de híbridos que producen anticuerpos de forma estable como describieron originalmente Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495-497. Sin embargo, la utilidad terapéutica de los anticuerpos de base murina en los seres humanos está dificultada por la respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) debido a su origen no humano. Las estrategias para preparar anticuerpos monoclonales humanos o semejantes a humanos han sido posibles mediante la ingeniería genética. Sin embargo, los procedimientos disponibles hasta ahora presentan el inconveniente de que no son adecuados para producir anticuerpos con las características de los producidos en el curso de una respuesta inmunitaria fisiológica humana. Además, dichos anticuerpos pueden no ser lo suficientemente específicos debido a la reactividad cruzada con otras proteínas y/o la proteína diana en contexto con la función fisiológica normal. En el caso de la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, por ejemplo, se considera que los anticuerpos que también reaccionan de manera cruzada con alta afinidad con derivados fisiológicos de la proteína precursora del amiloide (APP) o alfa sinucleína presentan efectos secundarios relacionados con las funciones normales de las estructuras diana fisiológicas. A este respecto, una enfermedad autoinmunitaria no deseada se induciría de forma completa -un riesgo difícilmente calculable en el diseño conceptual de experimentos de inmunización activa que emplean estructuras proteicas que, en forma variante, también se producen fisiológicamente. Los efectos secundarios no relacionados con la estructura diana son, por ejemplo, reacciones anafilácticas, como se esperaría como efectos secundarios no deseados y temidos de la administración sistémica de proteínas exógenas. De acuerdo con descubrimientos recientes, éste también puede ser el caso en los anticuerpos denominados humanizados, que surgen originariamente de organismos no humanos, habitualmente de ratones. Por otra parte, la inmunización activa con antígenos patológicos relevantes presenta el riesgo considerable de que los pacientes desarrollen anticuerpos y respuestas de células T que también reconocen variantes fisiológicas de dichas proteínas y, consecuentemente, dan lugar a una respuesta autoinmunitaria peligrosa e incontrolable. Los anticuerpos que reconocen un epítomo de beta-amiloide presente en secciones cerebrales enfermas, pero no en secciones de controles sanos y que no reconocen la proteína precursora de amiloide han sido descritos en la técnica (Geylis y col. Neurobiology of Aging, vol. 26, no. 5, mayo de 2005, páginas 597-606).

De este modo, existe una necesidad de proporcionar agentes que sean específicos para una diana implicada en un trastorno y que sean tolerados por el cuerpo humano.

45

RESUMEN DE LA INVENCION

El problema técnico que subyace a la presente invención ha sido resuelto por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

50

La presente invención hace uso del descubrimiento sorprendente de que los anticuerpos también pueden estar dirigidos contra variantes patofisiológicamente relevantes de proteínas endógenas, en particular contra neoepítomos, que se forman debido a la alteración patológica de la de transcripción, traducción o modificación posterior a la transcripción o posterior a la traducción o procesamiento proteolítico o agregación. Dichos anticuerpos están dirigidos contra proteínas endógenas que, debido a su nueva estructura que se desvía de la fisiología normal, se vuelven patofisiológicamente relevantes mediante el desarrollo de efectos patológicos. Por razones de tolerancia inmunitaria, los anticuerpos conectados con la respuesta inmunitaria correspondiente a neoepítomos en dichas variantes patológicas no presentan normalmente, sin embargo, ninguna reacción cruzada contra las proteínas fisiológicamente funcionales, a diferencia del caso de las enfermedades autoinmunitarias. Esto se debe a que la formación de anticuerpos con reactividad cruzada potencial se suprime específicamente por los mecanismos

conocidos de tolerancia, mientras que el desarrollo de una respuesta inmunitaria a neoepítomos patológicos puede escapar a la tolerancia.

La presente invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una región variable de cadena pesada (VH) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera (VL) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 41. Como alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, xenogénico o quimérico humano-murino, siendo el último particularmente útil para los procedimientos de diagnóstico y estudios en animales. También están incluidas las composiciones terapéuticas que incluyen el anticuerpo o fragmentos activos del mismo, o agonistas y moléculas cognadas, o como alternativa, antagonistas del mismo, y los procedimientos de uso de dichas composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad usando estas composiciones, en el que una cantidad efectiva de la composición se administra a un paciente que necesita dicho tratamiento.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento de cadena sencilla Fv, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂ o cualquier otro fragmento de unión a antígeno. En una realización específica, a continuación, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humano de isotipo IgG.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Dicha región variable comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tal como se muestran en la tabla 4.

Por consiguiente, la presente invención también abarca vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped transformadas con estos, así como su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes que son específicas para neoepítomos que son indicativos y/o causantes de la enfermedad de Alzheimer.

El anticuerpo, la cadena o cadenas de inmunoglobulina, fragmentos de unión del mismo y la unión a antígeno a dicho anticuerpo pueden usarse en composiciones farmacéuticas y de diagnóstico para inmunoterapia y diagnóstico, respectivamente. Sin embargo, se prefiere el uso de las composiciones anteriores en la preparación de un medicamento.

Por lo tanto, es un objetivo particular de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento o prevención o ralentización del inicio de enfermedades asociadas con la acumulación y depósito del péptido beta amiloide en un sujeto, tal como enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, disfunción cognitiva leve, angiopatía amiloide cerebral, demencia vascular, demencia multi-infarto. El tratamiento comprende administrar una concentración eficaz de un anticuerpo o derivado de anticuerpo al sujeto en el que el anticuerpo se une a la forma patológica de la proteína o el depósito de proteínas con una afinidad mayor que a la forma fisiológica normal de la proteína.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Anticuerpo contra beta-amiloide. **A:** Anticuerpos humanos. **B:** Tinción de control con anticuerpo conocido contra beta-amiloide humano. Los pacientes excepcionalmente estables clínicamente con enfermedad de Alzheimer contienen anticuerpos contra las placas beta-amiloides. La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos de pacientes excepcionalmente estables clínicamente en secciones cerebrales obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente revela anticuerpos que se unen a las placas beta-amiloides confirmados por un anticuerpo conocido contra beta-amiloide humano.

Figura 2: Anticuerpo contra ovillos neurofibrilares. **A:** Anticuerpos humanos. **B:** Tinción de control con anticuerpo conocido contra tau humano. Los sujetos humanos sanos contienen anticuerpos contra los ovillos neurofibrilares. La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos de sujetos sanos en secciones cerebrales obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente revela anticuerpos que se unen a los ovillos neurofibrilares confirmados por un anticuerpo conocido contra tau humano.

Figura 3: Anticuerpo contra neuritas distróficas. **A:** Anticuerpos humanos. **B:** Tinción de control con anticuerpo conocido contra tau humano. Los sujetos humanos sanos contienen anticuerpos contra las neuritas distróficas. La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos de sujetos sanos en secciones cerebrales obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente revela anticuerpos que se unen a neuritas distróficas.

Figura 4: Anticuerpo contra beta-amiloide. La figura muestra la unión específica del anticuerpo humano

recombinante NI-101.11 que se aisló de un paciente excepcionalmente estable clínicamente con enfermedad de Alzheimer contra placas beta-amiloides cerebrales. Las secciones cerebrales obtenidas de un paciente con enfermedad de Alzheimer confirmada neuropatológicamente se tiñeron con anticuerpo humano recombinante a las concentraciones indicadas. La unión del anticuerpo a las placas beta-amiloides con concentraciones de 50 pM sugiere una unión de alta afinidad.

Figura 5: La unión del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a placas beta-amiloides no se ve afectada por competencia por polipéptidos Abeta sintéticos lineales N-terminales. La unión del anticuerpo recombinante contra beta-amiloide cerebral (0,5 nM) no se ve afectada por competencia por el polipéptido derivado de Abeta N-terminal que representa las posiciones 1 a 16 a concentraciones de hasta 1 μ M.

Figura 6: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 reconoce un epítipo conformacional Abeta que no está presente en Abeta monomérico. La unión de NI-101.11 a las placas beta-amiloides en secciones cerebrales puede verse afectada por competencia por fibrillas Abetal-42 pero no por monómeros Abetal-42 sintéticos lineales.

Figura 7: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 no se une a Abeta sintético lineal, monomérico en Western blots. Las preparaciones de Abeta monomérico se separaron por PAGE no desnaturizante. La proteína transferida se sondeó con anticuerpo humano recombinante contra beta-amiloide y anticuerpos de control contra secuencias Abeta lineales N-terminales (6E10). No se detectó unión de NI-101.11 a Abeta monomérico. Esta observación sugiere que el anticuerpo reconoce un epítipo conformacional de Abeta.

Figura 8: El anticuerpo humano NI-101.11 se une a fibrillas amiloides artificiales preparadas a partir de péptidos Abetal-42 sintéticos. Las fibrillas sintéticas Abeta o Abeta sintético monomérico que se utilizaron para recubrir placas ELISA a densidades de recubrimiento iguales se incubaron con anticuerpos humanos recombinantes contra beta-amiloide cerebral a las concentraciones indicadas. La actividad de unión del anticuerpo humano contra beta-amiloide cerebral a fibrillas amiloides artificiales (cuadrados abiertos) es más de 100 veces mayor comparado con Abeta monomérico (cuadrados llenos). El anticuerpo de control 22C4 se une preferentemente a Abeta monomérico (círculos llenos) y peor a fibrillas (círculos abiertos). Esto sugiere que NI-101.11 reconoce un epítipo conformacional que también está presente en las fibrillas amiloides artificiales preparadas a partir de péptidos Abeta sintéticos.

Figura 9: Ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a APP celular de longitud completa o con cualquiera de sus derivados fisiológicos que aparecen en células cultivadas. A diferencia del anticuerpo de control (6E10) que se une a APP de la superficie celular, está ausente la unión de NI-101.11 a APP de longitud completa presente en la superficie celular. Estos datos demuestran la ausencia de reactividad cruzada de NI-101.11 a APP celular, fisiológica de longitud completa.

Figura 10A-C: Ausencia de unión de NI-101.11 a Abeta monomérico mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las figuras 10A y 10B muestran ausencia de unión de NI-101.11 o un anticuerpo de control no relacionado a Abetal-42 monomérico etiquetado con FITC, mientras que la figura 10C muestra una unión prominente del anticuerpo 22C4 que reconoce un epítipo lineal presente en el extremo C de Abeta.

Figura 11: ELISA de competencia que muestra que la unión del anticuerpo 6E10, un anticuerpo dirigido contra un epítipo lineal en el extremo N de Abeta, podía bloquearse completamente después de pre-incubación con concentraciones en exceso de péptidos Abeta monoméricos, mientras que la pre-incubación con concentraciones en exceso de estas preparaciones de péptido Abeta monomérico no suprimió la unión de NI-101.11.

Figura 15: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 contra beta-amiloide cerebral cruza la barrera hematoencefálica en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer y se une a las placas beta-amiloides cerebrales *in vivo*.

Figura 16A-B: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 mejora el comportamiento cognitivo anormal en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer. Se trataron ratones arcAbeta de 24 meses de edad semanalmente i.p. con 3 mg/kg de anticuerpo durante 2 meses. Se realizó un ensayo de comportamiento en laberinto en Y antes y después de la finalización del tratamiento.

Figura 17: Penetración de la barrera hematoencefálica y decoración de placas amiloides por NI-101.11 administrado periféricamente. El NI-101.11 puede cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a depósitos beta-amiloides en ratones tratados con NI-101.11 (panel izquierdo) mientras que no es visible dicha tinción en animales tratados con el anticuerpo humano de control (panel derecho). El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 reduce la carga de placa beta-amiloide cerebral después del tratamiento sistémico durante dos meses.

Figura 18: La inmunización pasiva con NI-101.11 reduce la carga beta-amiloide en ratones arcAbeta. (A, B) Los análisis de la carga de placa con Tioflavina S y Rojo Congo revelan reducciones significativas de más del 50% en comparación con los animales tratados con el anticuerpo de control (Mann-Whitney U; $p=0,02$ para corteza, $p=0,009$ para hipocampo para TioS y $p=0,009$ para corteza y $p=0,04$ para hipocampo para análisis con Rojo Congo). Barra de escala: 200 μm . (C-E). El análisis con Tioflavina S revela una reducción significativa en la carga de beta-amiloide (C), número de placas beta-amiloides (D) y tamaño medio de las placas (E) en ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 en comparación con los animales tratados de control. Estadística de Mann-Whitney U: $p=0,02$ para área de placa en corteza; $p=0,009$ para área de placa en hipocampo; $p=0,047$ para número de placas en la corteza; $p=0,047$ para número de placas en el hipocampo; $p=0,009$ para tamaño de placas en la corteza; $p=0,009$ para número de placas en el hipocampo.

Figura 19: La carga beta-amiloide reducida está acompañada de astrocitosis y microgliosis reducidas A) La cuantificación de tinción anti-GFAP reveló una reducción significativa en el número de astrocitos reactivos en la corteza de ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 en comparación con transgénicos tratados con control. B) La cuantificación de tinción Iba-1 mostró una tendencia hacia un número reducido de microglia activada en ratones tratados con NI-101.11 en la corteza y el hipocampo. Barra de escala: 200 μm .

Figura 20: Ausencia de incremento de microhemorragias cerebrales después de dos meses de tratamiento con anticuerpo humano recombinante NI-101.11. Se trataron ratones arcAbeta de 24 meses de edad con angiopatía amiloide congófilica masiva probada semanalmente i.p. con 3 mg/kg de anticuerpo durante 2 meses. Foto representativa de una microhemorragia cerebral en ratones arcAbeta revelada por tinción con azul de Prusia de Perl (izquierda). El análisis cuantitativo demuestra una frecuencia significativamente elevada de microhemorragias en ratones transgénicos arcAbeta en comparación con los miembros de su camada de tipo silvestre. El tratamiento crónico con NI-101.11 no dio como resultado una frecuencia incrementada de microhemorragias. Barra de escala: 20 μm .

Figura 21: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 inhibe la formación de fibrillas sintéticas de Abeta *in vitro*. El efecto del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 en la formación de fibrillas de Abeta se ensayó midiendo Tioflavina S unida a Abeta agregado por análisis de fluorescencia.

Figura 22: Se midió la fagocitosis dependiente de la dosis, mediada por anticuerpo, de fibrillas Abeta1-42-FITC por células microgliales BV-2 después de inhibición del sistema de receptor de material trampa ("scavenger"). NI-101.11 desencadena una fagocitosis potente mediada por el receptor Fc γ dependiente de la dosis de fibrillas Abeta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el presente documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión a antígeno que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de inmunoglobulinas en los sistemas de vertebrados se entienden relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988).

Como se discutirá con más detalle más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende diversas clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Los expertos en la materia entenderán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases (isotipos) de inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por el experto en la materia a la vista de la presente descripción y, de acuerdo con esto, están dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente invención, la discusión siguiente estará dirigida generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos con un peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con un peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas típicamente por puentes disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras reúnen a las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí y las partes de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas bien por hibridomas, células B o células huésped manipuladas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un extremo N en los extremos en horquilla de la configuración Y hasta el extremo C en el final de cada cadena.

Tanto las cadenas ligeras como pesadas están divididas en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables tanto de las partes de cadena ligera (VL) como pesada (VH) determinan el reconocimiento y especificidad del antígeno. A la inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión a receptor Fc, unión a complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante se incrementa al alejarse del sitio de unión a antígeno o extremo amino del anticuerpo. La parte N-terminal es una región variable y en la parte C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden realmente el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítomos en antígenos. Esto es, el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria de anticuerpo forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL. Cualquier fragmento de anticuerpo o inmunoglobulina que contiene estructura suficiente para unirse específicamente a un antígeno se indica en el presente documento indistintamente como un "fragmento de unión a antígeno" o un "fragmento inmuno-específico".

En los anticuerpos naturales, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que están situadas específicamente para formar el dominio de unión a antígeno al asumir el anticuerpo su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Los aminoácidos restantes en los dominios de unión a antígeno, denominados regiones "marco", muestran menos variabilidad inter-molecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . De este modo, las regiones marco actúan para formar un armazón que proporciona el posicionamiento de las CDR en una orientación correcta por interacciones inter-cadena, no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítomo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria estimula la unión no covalente del anticuerpo a su epítomo correspondiente. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, pueden ser identificados fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por un experto en la materia, ya que han sido definidos de manera precisa (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., y col., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987).

En el caso en el que existen dos o más definiciones de un término que se usa y/o acepta en la técnica, la definición del término tal y como se usa en el presente documento se pretende que incluya todos estos significados a no ser que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso de la expresión "región determinante de la complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación a antígeno no contiguos encontrados en la región variable de los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat y col., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia y col., J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987), en las que las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se compara una con la otra. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo se pretende que esté dentro del alcance del término como se define y usa en el presente documento. Los residuos de aminoácidos apropiados que engloban las CDR como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente se muestran más adelante en la tabla 1 como una comparación. Los números exactos de los residuos que engloban una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar rutinariamente qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla 1: definiciones de CDR¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla 1 es de acuerdo con las convenciones de numeración mostradas por Kabat y col. (véase más adelante)

Kabat y col., también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar sin ambigüedad este sistema de “numeración de Kabat” a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de cualquier dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Tal y como se usa en el presente documento, la “numeración de Kabat” se refiere al sistema de numeración mostrado por Kabat y col., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983). A no ser que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos de aminoácidos en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos inmunoespecíficos, variantes o derivados de los mismos de la invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión a epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fvs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden bien un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos descritos en el presente documento). Las moléculas scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado de ésta con una estructura pentavalente. En particular, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente uso terapéutico, las IgM son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de unión correspondientes, ya que las IgM debido a su estructura pentavalente y ausencia de maduración por afinidad muestran frecuentemente reactividades cruzadas inespecíficas y afinidad muy baja.

Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la o las regiones variables solas o en combinación con todo o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También están incluidos en la invención fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos de la presente invención pueden tener cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o pollo. En otra realización, la región variable puede tener origen condrictoide (por ejemplo, de tiburones). Tal y como se usa en el presente documento, los anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de pacientes humanos, bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe a continuación y, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.939.598 por Kucherlapati y col. Un anticuerpo humano todavía es “humano” incluso si se hacen sustituciones de aminoácidos en el anticuerpo, por ejemplo, para mejorar las características de unión.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión “parte de cadena pesada” incluye las secuencias de aminoácidos derivadas de la cadena pesada de una inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una parte de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de estos. Por ejemplo, un polipéptido de unión para uso en la invención puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH3 o una

cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para uso en la invención puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Como se ha mostrado anteriormente, un experto en la materia entenderá que estos dominios (por ejemplo, las partes de cadena pesada) pueden modificarse de manera que varíen en la secuencia de aminoácidos respecto a la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, las partes de cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticas a aquellas en una segunda cadena polipeptídica del multímero. Como alternativa, los monómeros que contienen la parte de cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión a diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Las partes de cadena pesada de un polipéptido de unión para usarse en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una parte de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG4.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "parte de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferentemente, la parte de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

Se piensa que el tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo es aproximadamente de cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos de péptido o polipéptido contienen preferentemente al menos siete, más preferentemente al menos nueve y de la forma más preferente entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, incluso pueden no estar en la misma cadena peptídica. En la presente invención, el epítipo de péptido o polipéptido reconocido por los anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de Aβ.

El término "neopítipo", de acuerdo con la presente invención, indica un epítipo que es único para un patrón patológico y contenido en o formado por una proteína asociada con un trastorno que es una variante patológica de una proteína de lo contrario no patológica y/o que se desvía de la fisiología del estado sano. Dichas variantes patofisiológicas pueden formarse mediante transcripción patológicamente alterada, traducción patológicamente alterada, modificación posterior a la traducción, procesamiento proteolítico patológicamente alterado, formación de complejo patológicamente alterada con parejas de interacción fisiológicas o patofisiológicas o estructuras celulares en el sentido de una co-localización alterada o conformación estructural patológicamente alterada -como por ejemplo agregación, oligomerización o fibrilación - cuya estructura tri o cuatridimensional se diferencia de la estructura de la molécula fisiológicamente activa. Además, una variante patofisiológica también puede caracterizarse porque no está localizada en su entorno fisiológico o compartimento subcelular habitual. Como un ejemplo, los neopítopos pueden estar localizados en las estructuras patológicamente conspicuas en las áreas de tejidos cerebrales que experimentan obviamente o han experimentado ya daño funcional. Si una estructura dada, por ejemplo, célula o tejido, o proteína presenta un neopítipo puede verificarse revirtiendo el procedimiento descrito más adelante para aislar y caracterizar una molécula de unión específica de una proteína asociada con un trastorno en el que una molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo identificado por dicho procedimiento se usa para cribar una muestra para unión al anticuerpo, determinando de esta manera la presencia de un neopítipo.

Las frases "específico/a de proteína asociada con enfermedad" y "específico/a de neopítipo" se usan indistintamente en el presente documento con el término "que reconoce específicamente un neopítipo". Tal y como se usan en el presente documento, las expresiones tales como "ausencia de reactividad cruzada", "específico/a", "que reconoce específicamente", "que se une específicamente", "que se une preferentemente" y similares se refieren a la capacidad de la molécula de unión para discriminar entre el neopítipo de una proteína asociada con un trastorno y la proteína nativa en su forma de tipo silvestre y contexto natural. De este modo, la molécula de unión de la presente invención tiene una afinidad de unión preferente al neopítipo sobre el antígeno de la proteína nativa

por un factor de al menos dos, preferentemente al menos 5, habitualmente más de por un factor de 10, particularmente preferido por un factor de 50 e incluso más preferido mayor de 100. Además, la K_D relativa de la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo para el epítipo diana específico, por ejemplo, neoepítipo, es preferentemente al menos 10 veces menor, más preferentemente al menos 100 veces menor o más que la K_D para la unión de ese anticuerpo a otros ligandos o al equivalente nativo de la proteína asociada con la enfermedad.

Por “se une específicamente” o “reconoce específicamente”, usados indistintamente en el presente documento, se entiende generalmente que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno y que la unión conlleva alguna complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo “se une específicamente” a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo al azar, no relacionado. El término “especificidad” se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa por la que un determinado anticuerpo se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, el anticuerpo “A” puede considerarse que tiene una mayor especificidad para un epítipo dado que el anticuerpo “B” o puede decirse que el anticuerpo “A” se une al epítipo “C” con una mayor especificidad de la que tiene para un epítipo relacionado “D”.

Por “se une preferentemente” se entiende que la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo. De este modo, un anticuerpo que “se une preferentemente” a un epítipo dado se uniría más probablemente a ese epítipo que a un epítipo relacionado, a pesar de que dicho anticuerpo puede reaccionar de manera cruzada con el epítipo relacionado.

Como ejemplo no limitante, puede considerarse que una molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une a dicho primer epítipo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo.

En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una velocidad de disociación ($k(\text{off})$) que es menor que la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo.

Puede decirse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en el presente documento se une a un polipéptido diana descrito en el presente documento o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de disociación ($k(\text{off})$) de menos de o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ó 10^{-3} s^{-1} . Más preferentemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a un polipéptido diana descrito en el presente documento o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de disociación ($k(\text{off})$) menor de o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ó 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ó 10^{-7} s^{-1} .

Puede decirse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en el presente documento se une a un polipéptido diana descrito en el presente documento o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de asociación ($k(\text{on})$) mayor de o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ó $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Más preferentemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a un polipéptido diana descrito en el presente documento o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de asociación ($k(\text{on})$) mayor de o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ó $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ó $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Se dice que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo hasta el punto en el que bloquea, en algún grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos de ELISA de competencia. Puede decirse que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado al menos un 90%, al menos un 80%, al menos un 70%, al menos un 60% o al menos un 50%.

Tal y como se usa en el presente documento, el término “afinidad” se refiere a una medida de la fuerza de la unión

- de un epítipo individual con la CDR de una molécula de unión, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988) en las páginas 27-28. Tal y como se usa en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, esto es, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopos específicos como también con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo altamente repetitiva, tal como un polímero, sería una de alta avidez.
- 10 Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida de relación entre dos
- 15 sustancias antigénicas diferentes. De este modo, un anticuerpo reacciona de manera cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo que reacciona de manera cruzada contiene generalmente muchas de las mismas características estructurales complementarias que el epítipo inductor y, en algunos casos, realmente puede ajustarse mejor que el original.
- 20 Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, ya que se unen a epítopos relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítopos con al menos un 95%, al menos un 90%, al menos un 85%, al menos un 80%, al menos un 75%, al menos un 70%, al menos un 65%, al menos un 60%, al menos un 55% y al menos un 50% de identidad (según se calcula usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítipo de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad
- 25 cruzada si no se une a epítopos con menos de un 95%, menos de un 90%, menos de un 85%, menos de un 80%, menos de un 75%, menos de un 70%, menos de un 65%, menos de un 60%, menos de un 55% y menos de un 50% de identidad (según se calcula usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse "altamente específico" para un determinado epítipo, si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.
- 30 Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o
- 35 10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M ó 10^{-15} M.
- Como se ha indicado previamente, las estructuras de subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. Tal y como se usa en el presente
- 40 documento, la expresión "dominio VH" incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y la expresión "dominio CH1" incluye el primer (más amino terminal) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y es amino terminal respecto a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.
- 45 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "dominio CH2" incluye la parte de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 hasta el residuo 360 de un anticuerpo usando los esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración EU; véase Kabat EA y col. *op. cit.* El dominio CH2 es único porque no está emparejado de cerca con otro dominio. En lugar de esto, dos cadenas de carbohidrato ramificadas unidas por N
- 50 están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 al extremo C de la molécula IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.
- Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "región bisagra" incluye la parte de una molécula de
- 55 cadena pesada que une el dominio CH1 con el dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo de esta manera que las dos regiones de unión a antígeno N terminales se muevan independientemente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux y col., *J. Immunol.* 161: 4083 (1998)).
- 60 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado

entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayor parte de las moléculas IgG naturales, las regiones CH1 y CL están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración Kabat (posición 226 ó 229, sistema de numeración 5 EU).

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo genotecnológico” se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en cualquiera de la cadena pesada y ligera o ambas está alterado por al menos el reemplazo parcial de una o más CDR de un anticuerpo con especificidad conocida y, si es necesario, por reemplazo 10 parcial de la región marco y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones marco, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de una clase diferente y preferentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo genotecnológico en el que se injertan una o más CDR “donantes” de un anticuerpo no humano con especificidad conocida en una región marco de cadena pesada o ligera humana se denomina en el presente 15 documento un “anticuerpo humanizado”. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable del donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. En lugar de esto, puede ser necesario sólo transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión diana. Dadas las explicaciones mostradas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos No. 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370, estará dentro de la competencia de los expertos en la materia, bien 20 llevando a cabo experimentación rutinaria o por ensayo de prueba y error, obtener un anticuerpo genotecnológico o humanizado funcional.

Tal y como se usan en el presente documento, los términos “unido”, “fusionado” o “fusión” se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión entre sí de dos o más elementos o componentes, por cualquier medio 25 incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una “fusión en marco” se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) de polinucleótidos para formar un ORF continuo, más largo, de una manera que mantiene el marco de lectura de traducción correcto de los ORF originales. De este modo, una proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (segmentos que normalmente no están así unidos en la naturaleza). Aunque el 30 marco de lectura se hace, de este modo, continuo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar físicamente o espacialmente separados, por ejemplo, por secuencia enlazadora en marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de la región variable de una inmunoglobulina pueden estar fusionados, en marco, pero estar separados por un polinucleótido que codifica al menos una región marco de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDR “fusionadas” se co-traduzcan como parte de un polipéptido 35 continuo.

Tal y como se usan en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a la medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o diseminación del cáncer. Los resultados clínicos 40 beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya 45 presentan la afección o trastorno, así como aquellos con tendencia a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se quiere prevenir la manifestación de la afección o trastorno.

Por “sujeto” o “individuo” o “animal” o “paciente” o “mamífero” se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para el que se desea diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia. 50

La presente invención se refiere a una molécula de unión como se caracteriza en las reivindicaciones, que es capaz de reconocer selectivamente un epítipo de una proteína asociada a enfermedad incluyendo un neoepítipo de una proteína asociada a enfermedad, que puede obtenerse o validarse preferentemente por el procedimiento de la presente invención descrito anteriormente en el presente documento e ilustrado en los ejemplos. Ventajosamente, la 55 molécula de unión de la presente invención no reconoce sustancialmente dicha proteína en su forma no asociada a enfermedad; véase también anteriormente.

Los medios y procedimientos para la producción recombinante de moléculas de unión, en particular anticuerpos y miméticos de los mismos, así como los procedimientos para cribar moléculas de unión competitivas, que pueden o 60 no ser anticuerpos, se conocen en la técnica y se resumen, por ejemplo, en la solicitud internacional

WO2006/103116 respecto a anticuerpos contra beta-amiloide y el tratamiento/diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

5 Sin embargo, como se describe en el presente documento, en particular respecto a las aplicaciones terapéuticas en los seres humanos, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano. En este contexto, la proteína patológica variante reconocida por el anticuerpo está asociada con un trastorno neurológico, es decir, un trastorno del cerebro.

10 Además, como se demuestra en los ejemplos 3 a 5, la molécula de unión de la presente invención, en particular un anticuerpo tiene varias propiedades biológicas ventajosas, una o más de las cuales se han conseguido por la presente invención por primera vez, por ejemplo, es capaz de:

(i) cruzar la barrera hematoencefálica, por ejemplo, en el sitio del evento patológico;

15 (ii) unirse a placas beta-amiloides, amiloide cerebrovascular, depósitos Abeta difusos, ovillos neurofibrilares, tau hiperfosforilado, cuerpos de Lewy positivos para alfa-sinucleína o agregados proteicos asociados con neuritas distróficas;

20 (iii) eliminar placas beta-amiloides en el cerebro y/o prevenir la formación de placas amiloides en el cerebro;

(iv) restaurar sustancialmente el comportamiento normal, y/o

(v) no causar microhemorragias.

25 En una realización preferida particular, el anticuerpo o molécula de unión equivalente de la presente invención puede distinguirse de otros anticuerpos por una o más de las propiedades siguientes, por ejemplo, son capaces de:

1. pasar, al menos en cantidades pequeñas, la barrera hematoencefálica en el sitio de los eventos patológicos;

30 2. unirse a una o más estructuras extracelulares o celulares patofisiológicamente relevantes;

3. dar lugar a la reducción de la estructura patofisiológicamente relevante *in vitro* o *in vivo*;

35 4. dar lugar a la reducción de la estructura patofisiológicamente relevante y a la reducción de una toxicidad asociada con ella;

5. dar lugar al bloqueo o retraso del proceso de la enfermedad;

40 6. dar lugar a la regeneración de funciones celulares y específicas de órgano y de organismo y posiblemente a una prevención secundaria de la recurrencia de la patofisiología original después de la degradación de la toxicidad conectada con la estructura patofisiológicamente relevante; y/o

7. no está asociada con microhemorragias incrementadas.

45 Además, la ausencia de reactividad cruzada con precursores o derivados fisiológicos da lugar a la consecuencia de que, en primer lugar, las concentraciones son predecibles ya que se evitan los *efectos sumidero* en estructuras tisulares sanas y, en segundo lugar, las respuestas autoinmunitarias en el sentido de efectos secundarios no deseados se pierden sustancialmente. Además, los informes previos sugirieron una asociación de angiopatía amiloide cerebral (CAA) con reactividad vascular comprometida en un modelo de ratón transgénico con CAA
50 (Mueggler y col., J Neurosci 22 (2002), 7218-24). La CAA grave que ocurre en ratones arcA β viejos (Knobloch y col., Neurobiol. Aging 28: 1297-1306 (2007) epub 31 de julio, 2006) podría constreñir de este modo la flexibilidad vasodilatadora de los vasos sanguíneos afectados. De acuerdo con la presente invención, es prudente esperar que el tratamiento con los anticuerpos de la presente invención pueda mejorar la vasoreactividad y el flujo sanguíneo cerebral en ratones transgénicos APP viejos. Esto puede validarse usando el modelo de ratones arcA β descrito en
55 Knobloch y col. (2006), anteriormente, y descrito en la solicitud estadounidense "Transgenic animal model for Alzheimer's disease" de Grimm y col., número de serie 60/934.291 presentada el 11 de junio de 2007.

II. Anticuerpos

60 La presente invención se refiere, además, a las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión,

variantes y derivados de los mismos, mostrados en la tabla 2 y 3. La presente invención se refiere, más específicamente, a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente al mismo neoepítipo de una proteína asociada con un trastorno que el anticuerpo de referencia NI-101.12F6A.

5

La invención está dirigida además a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia NI-101.12F6A al neoepítipo de una proteína asociada con un trastorno.

10 La invención también está dirigida a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio de unión a antígeno idéntico al del anticuerpo NI-101.12F6A.

La presente invención ejemplifica, además, varias de dichas moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, que pueden caracterizarse por comprender en su región variable, por ejemplo,

15 dominio de unión, la una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable V_H y V_L que comprende las secuencias de aminoácidos representadas en la tabla 2 (V_H) y tabla 3 (V_L).

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de la región V_H de anticuerpos específicos de beta-amiloide.

Anticuerpo	Secuencia de cadena pesada variable
NI-101.11	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDTGKTKK YYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGT TQTVSS (SEQ ID NO: 6)
NI-101.12F 6A	QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDTGKTKK YYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGT TQTVSS (SEQ ID NO: 39)

20

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de la región V_L de anticuerpos específicos de beta-amiloide.

Anticuerpo	Secuencia de cadena ligera variable (kappa o lambda)
NI-101.11	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 8)
NI-101.12F 6A	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIKR (SEQ ID NO: 41)

Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican las regiones variables identificadas anteriormente se muestran en la lista de secuencias adjunta. El conjunto de CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región V_H y V_L según se representan en las tablas 2 y 3 se proporciona en la tabla 4. Sin embargo, tal como se describe en lo sucesivo, el experto en la materia es muy consciente del hecho de que pueden usarse CDR, además o como alternativa, que se diferencian en su secuencia de aminoácidos de las mostradas en la tabla 4 por uno, dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

25

Tabla 4: Denominación de secuencias de proteínas de CDR en nomenclatura Kabat de regiones V_H y V_L de anticuerpos específicos de beta-amiloide.

30

Anticuerpo	Cadena pesada variable	Cadena ligera variable
NI-101.11		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)
NI-101.12F6A		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)

El anticuerpo de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_H y V_L del anticuerpo NI-101.12F6A tal como se representa en las tablas 2 y 3. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento F_v de cadena sencilla (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂. Para algunas aplicaciones, sólo se requieren las regiones variables de los anticuerpos, que pueden obtenerse tratando el anticuerpo con reactivos adecuados de manera que se generan partes Fab', Fab o

35

F(ab')₂. Dichos fragmentos son suficientes para uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican el acoplamiento de las partes inmunes específicas de inmunoglobulinas a reactivos de detección tales como radioisótopos.

- 5 La presente invención se refiere, además, a polipéptidos aislados que componen los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención comprenden polipéptidos, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que codifican regiones de unión a antígeno específicas derivadas de moléculas de inmunoglobulina. Una secuencia polipeptídica o de aminoácidos "derivada de" una proteína designada se refiere al origen del polipéptido que tiene una determinada secuencia de aminoácidos. En ciertos casos, la secuencia polipeptídica o de
- 10 aminoácidos que se deriva de una secuencia polipeptídica o de aminoácidos de partida particular tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la de la secuencia de partida, o una parte de ésta, en el que la parte consiste en al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos, al menos 30-50 aminoácidos o que un experto en la materia puede identificar de otra manera que tiene su origen en la secuencia de partida.
- 15 Una inmunoglobulina o su ADNc codificantes puede modificarse adicionalmente. De este modo, en una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende una cualquiera de la una o más etapas de producción de un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena sencilla, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo etiquetado o un análogo de uno cualquiera de los mismos. Los procedimientos correspondientes son conocidos para el experto en la materia y se describen, por ejemplo,
- 20 Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Cuando los derivados de dichos anticuerpos se obtienen por la técnica de presentación en fagos, puede usarse la resonancia de plasmón superficial como se emplea en el sistema BIAcore para incrementar la eficacia de los anticuerpos de fago que se unen al mismo epítipo que el de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción
- 25 de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO89/09622. Los procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y en la solicitud internacional WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos para utilizarse de acuerdo con la presente invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos, tales como anticuerpos humanos en ratones se describe, por ejemplo, en las solicitudes
- 30 internacionales WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO 96/33735. Como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en diversas formas además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como en cadenas sencillas; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO88/09344.
- 35 Los anticuerpos de la presente invención o su cadena o cadenas de inmunoglobulina correspondientes pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delección o delecciones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones, adición o adiciones de aminoácidos y/o recombinación o recombinaciones y/o cualesquiera otra u otras modificaciones conocidas en la técnica bien solas o en combinación. Los procedimientos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la
- 40 secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son muy conocidos para el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de la cadena lateral, modificaciones de la cadena principal y
- 45 modificaciones N y C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación y la unión de restos de carbohidrato o lípido, cofactores y similares. Asimismo, la presente invención abarca la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino fusionado a una molécula heteróloga, tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo carboxilo; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO00/30680 para los detalles técnicos correspondientes.
- 50 De acuerdo con lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica una molécula de unión de la presente invención, en el caso del anticuerpo preferentemente al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo como se ha descrito anteriormente. Típicamente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende al menos la V_H y/o V_L de la región variable de dicho anticuerpo. El
- 55 experto en la materia sabe que cada dominio variable (la cadena pesada V_H y la cadena ligera V_L) de un anticuerpo comprende tres regiones hipervariables, denominadas algunas veces regiones determinantes de la complementariedad o "CDR" flanqueadas por cuatro regiones marco relativamente conservadas o "FR" y se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. Las regiones hipervariables o CDR del subtipo IgG humano de anticuerpo comprenden residuos de aminoácidos desde los
- 60 residuos 24-34 (L1) , 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1) , 50-65 (H2) y

95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como describen Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991) y/o aquellos residuos de un bucle hipervariable, por ejemplo, los residuos 26-32 (L1) , 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1) , 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como describen Chothia y col., J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917. Los residuos marco o FR son aquellos residuos del dominio variable distintos de y que rodean a las regiones hipervariables. La expresión "unión específica" se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K_D) de 10^7 o menos, y se une al antígeno predeterminado con una K_D que es al menos dos veces menor que su K_D para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína o cualquier otro polipéptido especificado) distinto del antígeno predeterminado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno". Tal y como se usa en el presente documento, la unión "altamente específica" significa que la K_D relativa del anticuerpo para el epítipo diana específico, por ejemplo, neoepítipo, es al menos 10 veces menor que la K_D para la unión del anticuerpo a otros ligandos o al equivalente nativo de la proteína asociada a enfermedad.

La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente usando cualquier procedimiento adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky y col., "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press Nueva York, NY (1984), Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company Nueva York, NY (1992) y los procedimientos descritos en el presente documento. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno incluyen ELISA, RIA y resonancia de plasmón superficial. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. De este modo, las medidas de la afinidad y otros parámetros de la unión del antígeno, por ejemplo, K_D , CI_{50} , se hacen preferentemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno y un tampón estandarizado.

El experto en la materia entenderá fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito anteriormente puede usarse para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos con la especificidad y función biológica deseadas. De este modo, la presente invención también abarca polipéptidos y anticuerpos que comprenden al menos una CDR del dominio variable descrito anteriormente y que tienen, ventajosamente, sustancialmente las mismas propiedades de unión o similares que el anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos. El experto en la materia entenderá fácilmente que, mediante el uso de los dominios variables o CDR descritos en el presente documento, se pueden construir anticuerpos de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las solicitudes de patente europea EP 0 451 216 A1 y EP 0 549 581 A1. Además, el experto en la materia sabe que la afinidad de unión puede potenciarse haciendo sustituciones de aminoácidos en las CDR o en los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) que se solapan parcialmente con las CDR según se define por Kabat. De este modo, la presente invención también se refiere a anticuerpos en los que una o más de las CDR mencionadas comprenden una o más, preferentemente no más de dos, sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, el anticuerpo de la invención comprende en una o ambas de sus cadenas de inmunoglobulina dos de o las tres CDR regiones variables, como se muestra en la tabla 4.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, como conocen los expertos en la materia, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante de un anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células a través de la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Existen una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo engullimiento y destrucción de las partículas recubiertas por anticuerpo, aclaramiento de los complejos inmunitarios, lisis de las células diana recubiertas por anticuerpo por las células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.

Por consiguiente, ciertas realizaciones de la invención incluyen un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en el que al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante ha sido eliminada o alterada de otra manera de manera que se proporcionen características bioquímicas deseadas

tales como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerización no covalente, capacidad incrementada de localizarse en el sitio de un tumor, semivida sérica reducida o semivida sérica incrementada cuando se compara con un anticuerpo completo, inalterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, determinados anticuerpos para usarse en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento son anticuerpos con dominios eliminados que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen al menos de una parte de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, un dominio entero de la región constante del anticuerpo modificado estará eliminado, por ejemplo, todo o parte del dominio CH2 estará eliminado. En otras realizaciones, ciertos anticuerpos para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG, que está alterada para eliminar la glicosilación, denominados en otro lugar del presente documento como anticuerpos aglicosilados o "agli". Dichos anticuerpos "agli" pueden prepararse enzimáticamente, así como por manipulación genética del sitio o sitios de glicosilación consensuados en la región constante. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría, se cree que los anticuerpos "agli" pueden tener un perfil incrementado de seguridad y estabilidad *in vivo*. Los procedimientos para producir anticuerpos aglicosilados, que tienen una función efectora deseada se encuentran, por ejemplo, en el documento WO 2005/018572.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, la parte Fc puede estar mutada para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la delección o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante incrementando de esta manera la localización tumoral. En otros casos, puede ser que las modificaciones en la región constante coherentes con la presente invención, moderen la unión al complemento y reduzcan así la semivida sérica y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Otras modificaciones más de la región constante pueden usarse para modificar las uniones disulfuro o restos oligosacáridicos que permiten la localización aumentada debido a una especificidad de antígeno o flexibilidad del anticuerpo incrementadas. El perfil fisiológico, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como localización tumoral, biodistribución y vida media sérica, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas muy conocidas sin experimentación excesiva.

Las formas modificadas de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden prepararse a partir de anticuerpos precursores o parentales completos usando técnicas conocidas en la técnica. Las técnicas ejemplares se describen con más detalle en el presente documento.

En ciertas realizaciones, tanto las regiones variables como constantes de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención son totalmente humanas. Los anticuerpos totalmente humanos pueden prepararse usando técnicas que son conocidas en la técnica y como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos totalmente humanos contra un antígeno específico pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a una provocación antigénica, pero cuyos loci endógenos se han inhabilitado. Las técnicas ejemplares que pueden usarse para preparar dichos anticuerpos se describen en las patentes de Estados Unidos: 6.150.584; 6.458.592; 6.420.140. Otras técnicas son conocidas en la técnica. Los anticuerpos totalmente humanos pueden producirse asimismo por varias tecnologías de presentación, por ejemplo, presentación en fagos u otros sistemas de presentación virales, como se describe con más detalle en otro lugar del presente documento.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden prepararse o fabricarse usando técnicas que son conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de éstas se "producen recombinantemente", es decir, se producen usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas ejemplares para preparar moléculas de anticuerpo o fragmentos de éstas se describen con más detalle en otro lugar del presente documento.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también incluyen derivados que están modificados, por ejemplo, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de manera que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo cognado. Por ejemplo, pero no como limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de varias modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención no desencadenarán una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal que se va a tratar, por ejemplo, en un ser humano. En ciertas realizaciones, las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención derivan de un paciente, por ejemplo, un paciente humano y se usan posteriormente en la misma especie de la que derivan, por ejemplo, ser humano, aliviando o minimizando la aparición de respuestas inmunitarias perjudiciales.

La des-inmunización también puede usarse para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Tal y como se usa en el presente documento, el término "des-inmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítomos de las células T (véanse, por ejemplo, los documentos WO9852976A1, WO0034317A2). Por ejemplo, se analizan las secuencias de VH y VL del anticuerpo de partida y se "mapea" un epítomo de células T humano para cada región V que muestra la localización de los epítomos respecto a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítomos de células T individuales procedentes del mapa de epítomos de células T se analizan con el fin de identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un riesgo bajo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña una gama de secuencias de VH y VL alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en una gama de polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos específicos de neoepítomo o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para usarse en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento, que se ensayan entonces para función. Típicamente, se generan y ensayan entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes de cadena pesada y ligera completos que comprenden regiones modificadas V y C humanas se clonan en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos completos. Los anticuerpos se comparan a continuación en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados y se identifica la variante óptima.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). La expresión "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en el presente documento no está limitado a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al procedimiento por el que se produce. De este modo, la expresión "anticuerpo monoclonal" no está limitada a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se derivan de células B humanas que se han inmortalizado mediante transformación con el virus de Epstein-Barr, como se describe en el presente documento.

En el proceso muy conocido de hibridoma (Kohler y col., *Nature* 256: 495 (1975)) los linfocitos con una vida relativamente corta o mortales de un mamífero, por ejemplo, células B derivadas de un sujeto humano como se describe en el presente documento, se fusionan con una línea celular tumoral inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma), produciendo de este modo células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas únicas por selección, dilución y recrecimiento comprendiendo cada cepa individual genes específicos para la formación de un único anticuerpo. Producen anticuerpos que son homogéneos frente a un antígeno deseado y, respecto a su linaje genético puro, se denominan "monoclonales".

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma no fusionadas, parentales. Los expertos en la materia entenderán que los reactivos, líneas celulares y medios para la formación, selección y crecimiento de los hibridomas están disponibles en el mercado a partir de varias fuentes y protocolos estandarizados muy establecidos. Generalmente, el medio de cultivo en el que se crecen las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por ensayos *in vitro* tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o ensayos de unión a neoepítomo como se describe en el presente documento. Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer por procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, págs. 59-103 (1986)). Se

apreciará, además, que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína-A, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

5 Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden producirse de forma recombinante o por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

10

Los anticuerpos completamente humanos, tales como los descritos en el presente documento, son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo procedimientos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también, las patentes de Estados Unidos No. 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Los anticuerpos humanos de la presente invención se aíslan, por ejemplo, de pacientes que no tienen síntomas, pero que presentan el riesgo de desarrollar un trastorno, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o un paciente con el trastorno, pero con una evolución de la enfermedad excepcionalmente estable.

20

En otra realización, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales deseados puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped procariontas o eucariotas tales como, pero no limitado a, células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma que, de lo contrario, no producen las inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético como se describe en el presente documento) puede usarse para clonar secuencias de región constante y variable para la fabricación de anticuerpos como se describe en Newman y col., patente de Estados Unidos No. 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995. Esencialmente, esto conlleva la extracción de ARN de las células seleccionadas, conversión a ADNc y amplificación por PCR usando cebadores específicos de Ig. Los cebadores adecuados para este propósito también se describen en la patente de Estados Unidos No. 5.658.570. Como se describirá con más detalle más adelante, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado pueden hacerse crecer en cantidades relativamente grandes para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

35

En una realización específica, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada y/o ligera pueden inspeccionarse para identificar las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) por procedimientos que son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de la cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas de ADN recombinante rutinarias, una o más de las CDR pueden insertarse en regiones marco, por ejemplo, en regiones marco humanas. Las regiones marco pueden ser naturales o regiones marco consenso y preferentemente regiones marco humanas (véase, por ejemplo, Chothia y col., *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998) para una lista de regiones marco humanas). En ciertas realizaciones, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente al menos a un epítomo de un polipéptido deseado. En ciertas realizaciones, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones marco, por ejemplo, para mejorar la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, dichos procedimientos pueden usarse para realizar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracadena. Otras alteraciones en el polinucleótido están abarcadas por la presente invención y se encuentran dentro del alcance de la técnica.

45

50

Como alternativa, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de Estados Unidos No. 4.694.778; Bird, *Science* 242: 423-442 (1988); Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 85: 5879-5883 (1988); y Ward y col., *Nature* 334: 544-554 (1989)) para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman por la unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácido, dando como resultado un anticuerpo de cadena sencilla. También pueden usarse las técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra y col., *Science* 242: 1038-1041 (1988)).

55

60

En otra realización, los linfocitos pueden seleccionarse por micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, pueden aislarse células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, por ejemplo, un ser humano, y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden cribarse para IgG específicas que cumplan los criterios del cribado. Las células de pocillos positivos pueden aislarse.

5 Las células B productoras de Ig individuales pueden aislarse por FACS o identificándolas en un ensayo en placa hemolítico mediado por complemento. Las células B productoras de Ig pueden micromanipularse en un tubo y los genes VH y VL pueden amplificarse usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes VH y VL pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpo y transferirse a células (por ejemplo, células eucariotas o procariontas) para expresión.

10

Como alternativa, las líneas celulares productoras de anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse usando técnicas muy conocidas para el experto en la materia. Dichas técnicas se describen en diversos manuales de laboratorio y publicaciones importantes. A este respecto, las técnicas adecuadas para uso en la invención como se describe más adelante se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan y col., Eds., Green Publishing Associates and

15 Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o, preferentemente, por técnicas de expresión recombinante como se describe en el presente documento.

20

En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una región constante sintética en la que uno o más dominios están parcialmente o totalmente eliminados ("anticuerpos con dominio eliminado"). En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones o variantes con dominio eliminado en los se ha eliminado el dominio CH2 entero

25 (construcciones Δ CH2). Para otras realizaciones, puede utilizarse un péptido conector corto para sustituir el dominio eliminado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento a la región variable. Los expertos en la materia entenderán que dichas construcciones son particularmente preferidas debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 en la velocidad catabólica del anticuerpo. Las construcciones con dominio eliminado pueden derivarse usando un vector que codifica un dominio constante humano de IgG₁ (véase, por ejemplo, los documentos WO 30 02/060955 A2 y WO02/096948A2). Este vector se genomanipula para eliminar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante de IgG₁ con dominio eliminado.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención son minicuerpos. Los minicuerpos pueden prepararse usando procedimientos descritos en la

35

En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene delección o sustitución de unos pocos o incluso un único aminoácido, siempre que permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación

40 de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y de esta manera incrementar la localización tumoral. De manera similar, puede ser deseable eliminar simplemente la parte de uno o más dominios de región constante que controla la función efectora (por ejemplo, unión del complemento) que se va a modular. Dichas delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (semivida sérica) mientras deja otras funciones deseables

45 asociadas con el dominio de región constante sujeto intactas. Además, como se ha aludido anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que intensifica el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunógeno del anticuerpo modificado. Otras realizaciones más

50 comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para aumentar características deseables tales como función efectora o proporcionar más unión de citotoxina o carbohidrato. En dichas realizaciones, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones VH y/o regiones VL) descritas en el presente documento, uniéndose inmunoespecíficamente estos anticuerpos o fragmentos de los mismos a un polipéptido asociado con un trastorno o fragmento o variante del mismo. Las técnicas estándar conocidas para los expertos en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR

60 que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo derivados)

codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos

5 sustituciones de aminoácidos respecto a la región VH de referencia, VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, región VL, VL-CDR1, VL-CDR2 o VL-CDR3. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina,

10 histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente

15 a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para actividad biológica para identificar los mutantes que conservan la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a un polipéptido asociado con un trastorno).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones sólo en las regiones marco o sólo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones silenciosas o sustitutivas neutras, es decir, no

20 tienen ningún efecto o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo de unirse al antígeno, de hecho, algunas de dichas mutaciones no alteran la secuencia de aminoácidos de ninguna manera. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Las regiones codificantes con codones optimizados que codifican los anticuerpos de la presente

25 invención se describen en otro lugar del presente documento. Como alternativa, las mutaciones sustitutivas no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo de unirse al antígeno. La localización de la mayor parte de las mutaciones silenciosas y sustitutivas neutras probablemente sea en las regiones marco, mientras que la localización de la mayor parte de las mutaciones sustitutivas no neutras probablemente sea en CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la materia será capaz de diseñar y ensayar moléculas mutantes con propiedades

30 deseadas tales como ausencia de alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad de unirse inmunoespecíficamente al menos a un epítipo de un polipéptido asociado con un trastorno) puede determinarse usando técnicas descritas en el presente

35 documento o modificando rutinariamente técnicas conocidas en la técnica.

IV. Polinucleótidos que codifican anticuerpos

De acuerdo con lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica una molécula de unión de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo. En el caso del anticuerpo, el polinucleótido puede

40 codificar al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. El polinucleótido de la invención que codifica el anticuerpo descrito anteriormente, puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN producido sintéticamente o una molécula de ácido nucleico quimérico producida de forma recombinante que comprende cualquiera de estos polinucleótidos bien solo o en combinación. Preferentemente,

45 dicho polinucleótido es parte de un vector. Dichos vectores pueden comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permiten la selección de dicho vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas. Preferentemente, el polinucleótido de la invención está unido de manera operativa a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procariotas o eucariotas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un ARNm que se puede traducir. Los elementos

50 reguladores que garantizan la expresión en células eucariotas, preferentemente células de mamífero, son muy conocidos para los expertos en la materia. Habitualmente comprenden secuencias reguladoras que garantizan el inicio de la transcripción y opcionalmente señales poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción, así como de la traducción y/o regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas.

55 Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por ADN mono y bicatenario, ADN que es

60 una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono

y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede contener una o más bases modificadas o cadenas principales de ADN o ARN modificadas para estabilidad o por otras razones. Bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Pueden hacerse diversas modificaciones en el ADN y ARN; de este modo, "polinucleótido" engloba las formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente.

10

Puede crearse un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una parte de cadena pesada o parte de cadena ligera de inmunoglobulina) introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse por técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, se hacen sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales.

15

Como es bien conocido, el ARN puede aislarse de las células de hibridoma originales o de otras células transformadas por técnicas estándar, tales como extracción con isotiocianato de guanidinio y precipitación seguida de centrifugación o cromatografía. Cuando es deseable, el ARNm puede aislarse del ARN total por técnicas estándar tales como cromatografía en oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas son familiares en la técnica.

20

En una realización, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo pueden prepararse, bien simultáneamente o por separado, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa según procedimientos muy conocidos. La PCR puede iniciarse con cebadores de región constante consenso o con cebadores más específicos basados en las secuencias publicadas de ADN y aminoácidos de la cadena pesada y ligera. Como se ha descrito anteriormente, también puede usarse PCR para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas pueden cribarse con cebadores consenso o sondas homólogas mayores, tales como sondas de región constante de ratón.

25

El ADN, típicamente ADN plasmídico, puede aislarse de las células usando técnicas conocidas en la técnica, mapearse por restricción y secuenciarse según técnicas estándar muy conocidas mostradas con detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores referentes a técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético de acuerdo con la presente invención en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o análisis posterior.

30

La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL), que tiene secuencias polipeptídicas VL-CDR1, VL-CDR2 o VL-CDR3 mostradas en la tabla 4.

35

La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH), en la que las regiones VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 mostrados en la tabla 4.

40

45

Tabla 5: Secuencias polinucleotídicas de la región V_H de anticuerpos específicos de Abeta.

Anticuerpo	Secuencia de cadena pesada variable
NI-101.11 (SEQ ID NO:56)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGGTGAAGTAAATACTATAACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTA TACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (SEQ ID NO:5) (optimizada con codón)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGGCGTGGTGCAGCCCGGCCGAGCCTGCGGCTGAG CTGCGCCGCCAGCGGCTTCGCCTTCAGCAGCTACGGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCGGG CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCGTGATCTGGTTCGACGGCACCAAGAAGTACTACACCGACAGC GTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGACCGGGGCATCGGCGCCCGG CGGGGCCCTACTACATGGACGTGTGGGGCAAAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
NI-101.12F 6A (SEQ ID NO:38)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGGTGAAGTAAATACTATAACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTA TACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Tabla 6: Secuencias polinucleotídicas de la región V_L de anticuerpos específicos de Abeta.

Anticuerpo	Secuencia de cadena ligera variable (kappa o lambda)
NI-101.11 (SEQ ID NO:7)	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACT GTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTGCGCGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGTAC G
NI-101.12F 6A (SEQ ID NO:40)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGT GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTAC TGTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTGCGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT

A este respecto, el experto en la materia apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina o sólo una. Asimismo, dichos polinucleótidos pueden estar bajo el control del mismo promotor o pueden estar controlados por separado para expresión. Los elementos reguladores posibles que permiten la expresión en células huésped procariontes comprenden, por ejemplo, el promotor PL, lac, trp o tac en *E. coli* y los ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor CMV, SV40, RSV, potenciador CMV, potenciador SV40 o un intrón de globina en células de mamíferos y otros animales. Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de SV40 o el sitio poli-A de tk, cadena abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, pueden añadirse a la secuencia codificante del polinucleótido de la invención secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo al medio y son muy conocidas en la técnica. La o las secuencias líderes se ensamblan en la fase apropiada con las secuencias de traducción, inicio y terminación y, preferentemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una parte de ésta, al espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación C o N-terminal que confiere características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto, en la técnica se conocen vectores de expresión adecuados tales como vector de expresión de ADNc Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) o pSPORT1 (GIBCO BRL). Preferentemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas de promotor eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control para huéspedes procariontes. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias nucleotídicas y, si se desea, puede seguir la recogida y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada de inmunoglobulina o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina; véase, Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979).

La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en otra parte. Adicionalmente, los polinucleótidos que codifican polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en el presente documento, también están contemplados por la invención.

Los polinucleótidos pueden producirse o fabricarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia nucleotídica del anticuerpo es conocida, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier y col., *BioTechniques* 17: 242 (1994)), que, en resumen, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridar y ligar estos oligonucleótidos y amplificar los oligonucleótidos ligados por PCR.

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede generarse a partir de un ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente ARN poli A+, aislado a partir de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo específico de neoantígeno, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular que se quiere identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica.

Una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, su secuencia de nucleótidos puede manipularse usando procedimientos muy conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

60

V. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

La presente invención también implica un procedimiento para producir células capaces de expresar un anticuerpo de la invención o su o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes que comprende modificar células por ingeniería genética con el polinucleótido o con el vector de la invención. Las células que se pueden obtener con el procedimiento de la invención pueden usarse, por ejemplo, para ensayar la interacción del anticuerpo de la invención con su antígeno.

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos se insertan típicamente en un vector de expresión para introducción en células huésped que pueden usarse para producir la cantidad deseada de anticuerpo.

En el presente documento, se describe la expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o parte del mismo (que preferentemente contiene el dominio variable de cadena pesada o ligera) de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en a técnica. De este modo, los procedimientos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo se describen en el presente documento. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpo y señales apropiadas de control de la transcripción y la traducción. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención proporciona, por lo tanto, vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unida de manera operativa a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente de Estados Unidos No. 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para expresión de la cadena pesada o ligera completa.

La presente invención se refiere a vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden un polinucleótido que codifica el antígeno o preferentemente un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención; opcionalmente en combinación con un polinucleótido de la invención que codifica el dominio variable de la otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia de genes o de direccionamiento. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adeno-asociados, virus del herpes o virus del papiloma bovino pueden usarse para la administración de los polinucleótidos o vector de la invención en la población celular diana. Pueden usarse procedimientos que son muy conocidos para los expertos en la materia para construir vectores virales recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Como alternativa, los polinucleótidos y vectores de la invención pueden reconstituirse en liposomas para la administración a las células diana. Los vectores que contienen los polinucleótidos de la invención (por ejemplo, los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras de las cadenas de inmunoglobulina que codifican secuencias y secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped por procedimientos muy conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza habitualmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación pueden usarse para otros huéspedes celulares; véase Sambrook, anteriormente.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en el presente documento para significar vectores usados de acuerdo con la presente invención como un vehículo para introducir en y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como conocen los expertos en la materia, dichos vectores pueden seleccionarse fácilmente de entre el grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Para los fines de esta invención, pueden emplearse numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como virus de papiloma bovino,

virus de polio, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistronicos con sitios de unión a ribosomas internos. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de las células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxótrofo, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen del marcador seleccionable puede unirse directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducirse en la misma célula por cotransformación. También pueden necesitarse elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de splicing, así como promotores, potenciadores y señales de terminación de la transcripción.

10

En realizaciones particularmente preferidas, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (preferentemente humanos) sintéticos como se ha descrito anteriormente. En una realización, esto se efectúa usando un vector de expresión patentado de Biogen IDEC, Inc., denominado NEOSPLA (descrito en la patente de Estados Unidos 6.159.730). Este vector contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de beta-globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, el exón 1 y exón 2 de la neomicina fosfotransferasa, el gen de la dihidrofolato reductasa y secuencia líder. Se ha descubierto que este vector da como resultado un nivel de expresión muy alto de anticuerpos después de la incorporación de los genes de la región variable y constante, transfección en células CHO, seguida de selección en medio que contiene G418 y amplificación con metotrexato. Por supuesto, puede usarse en la presente invención cualquier vector de expresión que sea capaz de desencadenar la expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no están limitados a, los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponibles de Invitrogen, San Diego, CA) y el plásmido pCI (disponible de Promega, Madison, WI). En general, el cribado de grandes números de células transformadas para aquellas que expresan niveles adecuadamente altos de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina es experimentación rutinaria que puede llevarse a cabo, por ejemplo, con sistemas robóticos. Los sistemas de vectores también se enseñan en las patentes de Estados Unidos No. 5.736.137 y 5.658.570, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad en el presente documento. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, por ejemplo, > 30 pg/célula/día. Otros sistemas de vectores ejemplares se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.413.777.

En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden expresarse usando construcciones policistronicas tales como las descritas en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003-0157641 A1, presentada el 18 de noviembre de 2002. En estos novedosos sistemas de expresión, pueden producirse múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de una única construcción policistronica. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias IRES compatibles se describen en la patente de Estados Unidos No. 6.193.980. Los expertos en la materia apreciarán que dichos sistemas de expresión pueden usarse para producir eficazmente la gama completa de anticuerpos descrita en la presente solicitud.

Más generalmente, una vez que se ha preparado el vector o secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo, el vector de expresión puede introducirse en una célula huésped apropiada. La introducción del plásmido en la célula huésped puede conseguirse por varias técnicas muy conocidas para los expertos en la materia. Éstas incluyen, pero no están limitadas a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intactos. Véase, Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors" Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Capítulo 24.2, p. 470-472 (1988). Típicamente, la introducción de plásmidos en el huésped es mediante electroporación. Las células huésped que albergan la construcción de expresión se hacen crecer en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y cadenas pesadas y se ensayan para la síntesis de proteínas de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ejemplares incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de separación celular activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para uso en los procedimientos descritos en el presente documento. De este modo, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o una cadena pesada o ligera del mismo, unido de manera operativa a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de cadena doble, los vectores que codifican tanto las cadenas pesada como ligera pueden co-expresarse en la

célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla más adelante.

La presente invención se refiere, además, a células huésped transformadas con un polinucleótido o vector de la invención. Dicha célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota. El polinucleótido o vector de la invención, que está presente en la célula huésped, puede integrarse en el genoma de la célula huésped o puede mantenerse extracromosómicamente. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal o humana. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, aquellas del género *Saccharomyces*, en particular aquellas de la especie *S. cerevisiae*. El término "procariota" pretende incluir todas las bacterias que pueden transformarse o transfectarse con una molécula de ADN o ARN para la expresión de un anticuerpo de la invención o las cadenas de inmunoglobulina correspondientes. Los huéspedes procariotas pueden incluir bacterias gram negativas, así como gram positivas tales como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. El término "eucariota" pretende incluir células de levadura, planta superior, de insecto y preferentemente de mamífero, de la manera más preferente células HEK 293, NSO y CHO. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina, codificados por el polinucleótido de la presente invención pueden estar glicosilados o no glicosilados. Los anticuerpos de la invención o las cadenas de inmunoglobulina correspondientes también pueden incluir un residuo inicial del aminoácido metionina. Un polinucleótido de la invención puede usarse para transformar o transfectar el huésped usando cualquiera de las técnicas conocidas habitualmente por los expertos en la materia. Además, los procedimientos para preparar genes fusionados, unidos de manera operativa y expresarlos, por ejemplo, en células de mamífero y bacterias son muy conocidos en la técnica (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Las construcciones genéticas y los procedimientos descritos en ella pueden utilizarse para la expresión del anticuerpo de la invención o las cadenas de inmunoglobulina correspondientes en huéspedes eucariotas o procariotas. En general, se usan los vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficaz del polinucleótido insertado en relación con el huésped. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor y un terminador, así como genes específicos que son capaces de proporcionar la selección fenotípica de las células transformadas. Las células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y las células huésped para la expresión y secreción de inmunoglobulinas pueden obtenerse de varias fuentes, tal como la American Type Culture Collection ("*Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*", Quinta edición (1985) Rockville, Maryland, EEUU. Además, pueden usarse animales transgénicos, preferentemente mamíferos, que comprenden células de la invención, para la producción a gran escala del anticuerpo de la invención.

De este modo, en una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una molécula de unión específica de una proteína asociada con un trastorno, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión o una o más cadenas de inmunoglobulina del mismo, comprendiendo dicho procedimiento

(a) cultivar una célula tal como se ha descrito anteriormente; y

(b) aislar dicho antígeno, molécula de unión, anticuerpo o fragmento de unión o una o más cadenas de inmunoglobulina del mismo a partir del cultivo.

Los huéspedes transformados pueden hacerse crecer en fermentadores y cultivarse según técnicas conocidas en la técnica para conseguir un crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligera y pesada individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, pueden purificarse según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares; véase, Scopes, "*Protein Purification*", Springer Verlag, N.Y. (1982). El anticuerpo o sus una o más cadenas de inmunoglobulina correspondientes de la invención pueden aislarse del medio de crecimiento, lisados celulares o fracciones de membrana celular. El aislamiento y purificación, por ejemplo, de anticuerpos expresados recombinantemente o cadenas de inmunoglobulina de la invención puede ser por cualquier medio convencional, tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, por ejemplo, contra la región constante del anticuerpo de la invención. Será evidente para los expertos en la materia que los anticuerpos de la invención pueden acoplarse adicionalmente a otros restos, por ejemplo, para aplicaciones de direccionamiento de fármaco o formación de imágenes. Dicho acoplamiento puede realizarse químicamente después de la expresión del anticuerpo o antígeno en el sitio de la unión o el producto de acoplamiento puede prepararse por ingeniería en el anticuerpo o antígeno de la invención a nivel de ADN. Los ADN se expresan en un sistema huésped adecuado y las proteínas expresadas se recogen y renaturalizan, si es necesario.

Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras con al menos aproximadamente del 90 al 95% de homogeneidad y de la forma más preferida del 98 al 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una

vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los anticuerpos pueden usarse terapéuticamente (incluyendo extracorpóreamente) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo.

La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la misma expresión de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un único vector que codifica los dos polipéptidos, de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se sitúa ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322: 52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 77: 2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Tal y como se usa en el presente documento, "células huésped" se refiere a células que albergan vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procesos para el aislamiento de anticuerpos a partir de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo a no ser que se especifique claramente otra cosa. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar bien a partir de la centrifugación de las células completas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Puede utilizarse diversos sistemas de huésped-vector de expresión para expresar moléculas de anticuerpo para uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Dichos sistemas huésped-expresión representan vehículos por los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de nucleótidos codificantes apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Éstas incluyen pero no están limitadas a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5 K del virus vaccinia). Preferentemente, se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor principal del gen intermedio temprano de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking y col., Gene 45: 101 (1986); Cockett y col., Bio/Technology 8: 2 (1990)).

La línea celular huésped usada para la expresión de proteínas tiene frecuentemente un origen animal; los expertos en la materia están acreditados con la capacidad de determinar preferentemente las líneas celulares huésped particulares que son las más adecuadas para que se exprese en ellas el producto génico deseado. Las líneas celulares huésped ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, CHO (Ovario de Hámster Chino), DG44 y DUXB11 (líneas de Ovario de Hámster Chino, DHFR menos), HELA (carcinoma de cuello uterino humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de cría de hámster), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Se prefieren particularmente las células CHO. Las líneas celulares huésped están típicamente disponibles en servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o en la bibliografía publicada.

Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas o que modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el

procesamiento y modificación posteriores a la traducción de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico.

5

Para la producción con alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden prepararse por ingeniería líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células manipuladas genéticamente se hacen crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse a líneas celulares. Este procedimiento puede usarse ventajosamente para manipular genéticamente líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero no limitado a los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., *Cell* 11: 223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 48: 202 (1992)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy y col., *Cell* 22: 817 (1980)) pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y col., *Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 77: 357 (1980); O'Hare y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); TIB TECH 11 (5): 155-215 (mayo, 1993); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y col., *Gene* 30: 147 (1984)). Los procedimientos conocidos habitualmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., *J. Mol. Biol.* 150: 1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden incrementarse por amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, Nueva York, Vol. 3. (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen de anticuerpo, también se incrementará la producción del anticuerpo (Crouse y col., *Mol. Cell. Biol.* 3: 257 (1983)).

La producción *in vitro* permite el aumento de escala para proporcionar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular son conocidas en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo, en un reactor aireado o en un reactor con agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas o microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o se desea, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse por los procedimientos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en DEAE-celulosa o cromatografía por (inmuno-)afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferente de un polipéptido sintético de la región bisagra o antes de o posteriormente a la etapa de cromatografía HIC descrita en el presente documento.

Los genes que codifican los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden expresarse en células no de mamífero tales como células de bacterias o insecto o levaduras o vegetales. Las bacterias que captan fácilmente ácidos nucleicos incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Además, se apreciará que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente se vuelven parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben aislarse, purificarse y ensamblarse en moléculas funcionales. Cuando se desean formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se auto-ensamblarán en anticuerpos tetravalentes (WO02/096948A2).

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se quiere producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no están limitados a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 2: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante lacZ, de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509 (1989)); y similares. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas por adsorción y unión a una matriz de glutatión-perlas de agarosa seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la trombina o factor Xa proteasa de manera que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto GST.

Además de los procariotas, también pueden usarse microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el usado más habitualmente entre los microorganismos eucariotas, aunque una serie de cepas adicionales están disponibles habitualmente, por ejemplo, *Pichia pastoris*.

Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa habitualmente el plásmido YRp7, por ejemplo (Stinchcomb, y col., Nature 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene 7: 141 (1979); Tschemper y col., Gene 10: 157 (1980)). Este plásmido contiene ya el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85: 12 (1977)). La presencia de la lesión trp1 como una característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insecto, se usa típicamente el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado de forma recombinante, puede purificarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico por Proteína A y cromatografía de tamaño en columna), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Como alternativa, un procedimiento preferido para incrementar la afinidad de los anticuerpos de la descripción se describe en el documento US 2002 0123057 A1.

40 VI. Proteínas de fusión y conjugados

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender un dominio adicional, estando unido dicho dominio por enlaces covalentes o no covalentes. La unión puede estar basada en una fusión genética de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica y descritos anteriormente o puede realizarse, por ejemplo, por entrecruzamiento químico como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO94/04686. El dominio adicional presente en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo de la invención puede estar unido preferentemente por un enlazador flexible, ventajosamente un enlazador polipeptídico, en el que dicho enlazador polipeptídico comprende aminoácidos plurales, hidrófilos, unidos por enlace peptídico con una longitud suficiente como para abarcar la distancia entre el extremo C-terminal de dicho dominio adicional y el extremo N-terminal del anticuerpo de la invención o viceversa. El agente activo terapéuticamente o en diagnóstico puede acoplarse al anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo por varios medios. Éstos incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de cadena sencilla que comprenden las regiones variables del anticuerpo de la invención acopladas por procedimientos covalentes, tales como enlaces peptídicos, al agente activo terapéuticamente o en diagnóstico. Los ejemplos adicionales incluyen moléculas que comprenden al menos un fragmento de unión a antígeno acoplado a moléculas adicionales covalentemente o no covalentemente que incluyen aquellas en la lista siguiente ilustrativa no limitante. Trauneker, Int. J. Cancer Supp. SuDP 7 (1992), 51-52, describen el reactivo biespecífico janusina en el que la región Fv dirigida a CD3 está acoplada a CD4 soluble o a otros ligandos tales como OVCA e IL-7. De manera similar, las regiones variables del anticuerpo de la invención pueden construirse en moléculas Fv y acoplarse a ligandos alternativos tales como los ilustrados en el artículo citado. Higgins, J. Infect Disease 166 (1992), 198-202, describió un anticuerpo hetero-conjugado compuesto por

OKT3 entrecruzado con un anticuerpo dirigido a una secuencia específica en la región V3 de GP120. Dichos anticuerpos hetero-conjugados también pueden construirse usando al menos las regiones variables contenidas en el anticuerpo de los procedimientos de la invención. Los ejemplos adicionales de anticuerpos específicos incluyen aquellos descritos por Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194 y por Fanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 5 101-124.

En una realización adicional de la presente invención, la molécula de unión, anticuerpo, cadena de inmunoglobulina o un fragmento de unión del mismo o el antígeno se etiqueta de forma detectable. Los agentes de etiquetado pueden acoplarse bien directamente o indirectamente a los anticuerpos o antígenos de la invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto es por el uso de un resto espaciador.

Por lo tanto, la actividad biológica de las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos identificados aquí sugiere que tienen una afinidad suficiente como para hacerles candidatos potenciales para la localización de fármacos en células que expresan las estructuras superficiales apropiadas de la célula y tejido enfermo, respectivamente. Este direccionamiento y unión a células podría ser útil para la administración de agentes activos terapéuticamente o en diagnóstico y terapia génica/administración de genes. Las moléculas/partículas con un anticuerpo de la invención se unirán específicamente a células/tejidos que expresan la forma variante de la proteína patológica y, por lo tanto, podrían tener un uso diagnóstico y terapéutico. De este modo, la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede etiquetarse (por ejemplo, fluorescente, radiactivo, enzima, magnético nuclear, metal pesado) y usarse para detectar dianas específicas *in vivo* o *in vitro* incluyendo ensayos del tipo "inmunoquímica" *in vitro*. *In vivo* podrían usarse de una manera similar a técnicas de formación de imágenes en medicina nuclear para detectar tejidos, células u otro material que expresa el neoepitopo. De este modo, en una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de una molécula de unión o un anticuerpo de la presente invención o fragmento de unión del mismo para la preparación de una composición para la detección *in vivo* de o direccionamiento de un agente terapéutico y/o de diagnóstico de una proteína asociada con un trastorno en el cerebro, detectar, suprimir la formación de o reducir los agregados o conformaciones de proteína patológica en un sujeto, para mejorar la cognición o retrasar o revertir el deterioro cognitivo asociado con enfermedades o para la extracción extracorpórea de compuestos patológicos o sus precursores a partir de fluidos corporales.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos que normalmente no están asociados con un anticuerpo. Las modificaciones ejemplares se describen con más detalle más adelante. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo fv de cadena sencilla de la invención puede comprender una secuencia enlazadora flexible, o puede estar modificado para añadir un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina o una etiqueta).

Un polipéptido de anticuerpo de la invención puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión diana y al menos una parte heteróloga, es decir, una parte con la que no está unida naturalmente en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se ponen en contacto en el polipéptido de fusión o que pueden existir normalmente en la misma proteína, pero están situadas en una nueva reorganización en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión pueden crearse, por ejemplo, por síntesis química o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones del péptido están codificadas en la relación deseada.

El término "heterólogo" tal como se aplica a un polinucleótido o un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido se deriva de una entidad distinta de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, tal y como se usa en el presente documento, un "polipéptido heterólogo" que se va a fusionar a un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o análogo del mismo se deriva de un polipéptido no de inmunoglobulina de la misma especie o un polipéptido de inmunoglobulina o no de inmunoglobulina de una especie diferente.

Como se describe con más detalle en otro lugar del presente documento, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse, además, de forma recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden fusionarse o conjugarse de forma recombinante a moléculas útiles como etiquetas en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patente de Estados Unidos No. 5.314.995; y EP 60 396.387.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes.

5 Los anticuerpos pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamiento posterior a la traducción, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una bibliografía de investigación voluminosa. Las modificaciones pueden producirse en cualquier lugar en el anticuerpo, incluyendo el núcleo peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, o en restos tales como

10 carbohidratos. Se entenderá que puede estar presente el mismo tipo de modificación en el mismo grado o grados distintos en varios sitios en un anticuerpo dado. También, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales posteriores a la traducción o pueden prepararse por procedimientos sintéticos. Las

15 modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación,

20 miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York, 2ª Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter y col., *Meth Enzymol* 182: 626-646 (1990);

25 Rattan y col., *Ann NY Acad Sci* 663: 48-62 (1992)).

La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo y un polipéptido heterólogo. En una realización, una proteína de fusión de la invención comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de

30 aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes de los mismos, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En otra realización, una proteína de fusión para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres de las VH-CDR

35 de un anticuerpo, o fragmentos, variantes o derivados del mismo, o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres de las VL-CDR de un anticuerpo, o fragmentos, variantes o derivados del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En una realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una VH-CDR3 de un anticuerpo de la presente invención, o fragmento, derivado o variante del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga, en el que la proteína de fusión se une específicamente al menos a

40 un neopítipo de una proteína asociada a un trastorno. En otra realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región VH de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos una región VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos, derivados o variantes de los mismos y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferentemente, las regiones VH y VL de la proteína de fusión corresponden a una única fuente de anticuerpo (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente al menos a un neopítipo de una proteína asociada a un trastorno. En otra realización más, una

45 proteína de fusión para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las CDR de VH de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las CDR de VL de un anticuerpo, o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferentemente, dos,

50 tres, cuatro, cinco, seis o más de las VH-CDR o VL-CDR corresponden a una única fuente de anticuerpo (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también están abarcadas por la invención.

Las proteínas de fusión ejemplares notificadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T

55 (Gascoigne y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 84: 2936-2940 (1987)); CD4 (Capon y col., *Nature* 337: 525-531 (1989); Traunecker y col., *Nature* 339: 68-70 (1989); Zettmeissl y col., *DNA Cell Biol. EE. UU.* 9: 347-353 (1990); y Byrn y col., *Nature* 344: 667-670 (1990)); L-selectina (receptor de direccionamiento) (Watson y col., *J. Cell. Biol.* 110: 2221-2229 (1990); y Watson y col., *Nature* 349: 164-167 (1991)); CD44 (Aruffo y col., *Cell* 61: 1303-1313 (1990)); CD28 y B7 (Linsley y col., *J. Exp. Med.* 173: 721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley y col., *J. Exp. Med.* 174: 561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic y col., *Cell* 66: 1133-1144 (1991)); receptor de TNF (Ashkenazi y col., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. EE. UU. 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer y col., Eur. J. Immunol. 27: 2883-2886 (1991); y Peppel y col., J. Exp. Med. 174: 1483-1489 (1991)); y receptor de IgE (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, Resumen No. 1448 (1991)).

5 Como se describe en otro lugar del presente documento, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse a polipéptidos heterólogos para incrementar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para uso en inmunoensayos usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, puede conjugarse PEG con los anticuerpos de la invención para incrementar su semivida *in vivo*. Leong, S.R., y col., Cytokine 16: 106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54: 531 (2002); o Weir y col.,
10 Biochem. Soc. Transactions 30: 512 (2002).

Además, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina, tal como la marca
15 proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otras, muchas de las cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no están limitadas a, la marca "HA", que corresponde a un epitopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., Cell 37: 767 (1984)) y la marca "flag".

20 Las proteínas de fusión pueden prepararse usando procedimientos que son muy conocidos en la técnica (véanse por ejemplo las patentes de Estados Unidos No. 5.116.964 y 5.225.538). El sitio preciso en el que se hace la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de secreción o unión de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión se transfiere a una célula huésped para expresión.

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse con al menos una de diversas moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana, o para formación de imágenes o terapia del paciente. Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden etiquetarse o conjugarse bien antes o
30 después de la purificación, cuando se realiza purificación.

En particular, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

35 Los conjugados que son inmunotoxinas incluyendo anticuerpos convencionales se han descrito ampliamente en la técnica. Las toxinas pueden acoplarse a los anticuerpos por técnicas de acoplamiento convencionales o se pueden producir inmunotoxinas que contienen partes de toxina proteica como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse de una manera correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Son
40 ilustrativas de dichas inmunotoxinas las descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

La proteína de fusión descrita anteriormente puede comprender además un enlazador escindible o sitio de escisión para proteinasas. Estos restos espaciadores, a su vez, pueden ser insolubles o solubles (Diener y col., Science 231
45 (1986), 148) y pueden seleccionarse para permitir la liberación de fármacos a partir del antígeno en el sitio diana. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden acoplarse a los anticuerpos y antígenos de la presente invención para inmunoterapia son fármacos, radioisótopos, lectinas y toxinas. Los fármacos que pueden conjugarse con los anticuerpos y antígenos de la presente invención incluyen compuestos que se denominan convencionalmente fármacos tales como mitomicina C, daunorrubicina y vinblastina. En el uso de anticuerpos o antígenos conjugados
50 radioisotópicamente de la invención, por ejemplo, para inmunoterapia, determinados isótopos pueden ser más preferibles que otros dependiendo de factores tales como distribución en leucocitos, así como estabilidad y emisión. Dependiendo de la respuesta autoinmunitaria, algunos emisores pueden ser preferibles respecto a otros. En general, para inmunoterapia se prefieren los radioisótopos que emiten partículas α y β . Los preferidos son los emisores de corto alcance y alta energía tales como ^{212}Bi . Los ejemplos de radioisótopos que pueden unirse a los anticuerpos o
55 antígenos de la invención para fines terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd y ^{188}Re . Otros agentes terapéuticos que pueden acoplarse a la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, así como protocolos terapéuticos *ex vivo* e *in vivo* son conocidos o pueden averiguarse fácilmente por los expertos en la materia. Cuando sea apropiado, el experto en la materia puede usar un polinucleótido de la invención que codifica uno cualquiera de los anticuerpos,
60 antígenos o los vectores correspondientes descritos anteriormente en lugar del material proteináceo en sí mismo.

- Los expertos en la materia apreciarán que los conjugados también pueden ensamblarse usando diversas técnicas dependiendo del agente seleccionado que se va a conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión con un éster activado de biotina tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. De manera similar, los conjugados con un marcador fluorescente pueden prepararse en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, aquellos listados en el presente documento, o por reacción con un isotiocianato, preferentemente fluoresceína-isotiocianato. Los conjugados de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se preparan de una manera análoga.
- 5
- 10 La presente invención abarca además anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos pueden usarse en diagnóstico, por ejemplo, para monitorizar el desarrollo o progresión de una enfermedad neurológica como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un tratamiento y/o régimen de prevención dado. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante
- 15 o derivado del mismo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnósticos de acuerdo con la presente
- 20 invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes
- 25 incluyen luciferasa, luciferina y acuorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede etiquetarse de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con

30 quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge en el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de etiquetado quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Una de las formas en las que un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede etiquetarse de forma detectable es uniendo el mismo a una enzima y usando el producto unido en un inmunoensayo

35 enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quaterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2: 1-7 (1978)); Voller y col., J. Clin. Pathol. 31: 507-520 (1978); Butler, J.E., Meth. Enzymol. 73: 482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. y col., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kogaku Shoin, Tokio (1981). La enzima, que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferentemente un sustrato cromógeno, de tal

40 manera que produce un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para etiquetar de forma detectable el anticuerpo incluyen, pero no están limitadas a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, isomerasa delta-5-esteroide, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano

45 picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Adicionalmente, la detección puede conseguirse por procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromógeno para la enzima. La detección también puede conseguirse por comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de manera similar.

50 La detección también puede conseguirse usando cualquiera de diversos otros inmunoensayos. Por ejemplo, etiquetando de forma radiactiva el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (marzo de 1986)). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios que incluyen, pero no están limitados a, un contador gamma, un contador de centelleo o autorradiografía.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede etiquetarse de forma detectable usando metales que emiten fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de la serie lantánido. Estos metales

60 pueden unirse al anticuerpo usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminopentaacético

(DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Las técnicas para conjugar diversos restos a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo son muy conocidas, véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2ª Ed.)*, Robinson y col. (eds.), Marcel Dekker, Inc., págs. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), Academic Press págs. 303-16 (1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982).

En ciertas realizaciones, puede conjugarse un resto que potencie la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, por ejemplo, un polipéptido de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento inmunoespecífico del mismo. Por ejemplo, en una realización, puede conjugarse PEG a las moléculas de unión de la invención para incrementar su semivida *in vivo*. Leong, S.R., y col., *Cytokine* 16: 106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54: 531 (2002); o Weir y col., *Biochem. Soc. Transactions* 30: 512 (2002).

20 VII. Composiciones y procedimientos de uso

Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión mencionada anteriormente, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o derivados químicos del mismo, o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la presente invención puede comprender, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "derivado químico" describe una molécula que contiene restos químicos adicionales que normalmente no son una parte de la molécula base. Dichos restos pueden mejorar la solubilidad, semivida, absorción, etc., de la molécula base. Como alternativa, los restos pueden atenuar efectos secundarios no deseables de la molécula base o disminuir la toxicidad de la molécula base. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales tales como interleuquinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Por ejemplo, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, el agente adicional puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-Abeta y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, en una realización preferida particular, la presente invención se refiere al uso de la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o de una molécula de unión que tienen sustancialmente las mismas especificidades de unión de una cualquiera de éstas, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratar o prevenir la progresión de la enfermedad de Alzheimer; para la mejoría de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer; para diagnosticar o cribar a un sujeto para la presencia de la enfermedad de Alzheimer o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Dicha composición farmacéutica puede diseñarse para ser administrada por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intranasal, por vía parenteral o como un aerosol; véase también a continuación.

En una realización, la presente invención se refiere a los anticuerpos descritos anteriormente de la presente invención para uso en el tratamiento de un trastorno neurológico caracterizado por acumulación y/o depósito anormal de beta-amiloide en el sistema nervioso central. La expresión "trastorno neurológico" incluye, pero no se limita a, enfermedad de Alzheimer y disfunción cognitiva leve.

Una ventaja particular de la estrategia terapéutica de la presente invención se basa en el hecho de que los anticuerpos derivados de células B o células B de memoria de un organismo sano en fase preclínica o excepcionalmente estable clínicamente son, con cierta probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad clínicamente manifiesta, o de disminuir el riesgo de aparición de una enfermedad clínicamente manifiesta o de retrasar el momento de la aparición de una enfermedad clínicamente manifiesta. Típicamente, dichos anticuerpos también han experimentado ya con éxito la maduración somática, es decir, la optimización respecto a la selectividad y eficacia en la unión de alta afinidad a la molécula diana mediante la variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

El conocimiento de que dichas células *in vivo*, por ejemplo, en un ser humano, no se han activado mediante proteínas fisiológicas relacionadas u otras o estructuras celulares en el sentido de una reacción autoinmunitaria o alérgica también tiene una gran importancia médica, ya que esto significa una probabilidad considerablemente

incrementada de viabilidad exitosa durante las fases del ensayo clínico. Por así decirlo, la eficiencia, aceptabilidad y tolerabilidad se han demostrado ya antes del desarrollo preclínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en al menos un sujeto humano. De este modo, puede esperarse que, con un procedimiento de acuerdo con la presente invención, tanto la eficiencia específica de la estructura de la diana de un anticuerpo como agente terapéutico como su probabilidad disminuida de efectos secundarios incrementan significativamente su probabilidad de éxito en clínica.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende una cualquiera de las moléculas de unión, anticuerpos, fragmento de unión a antígeno, polinucleótidos, vectores o células descritos anteriormente de la invención y opcionalmente medios adecuados para la detección tales como reactivos usados convencionalmente en procedimientos de diagnóstico basados en el sistema inmunitario o ácido nucleico. Los anticuerpos de la invención son adecuados, por ejemplo, para uso en inmunoensayos en los que pueden utilizarse en fase líquida o unidos a un vehículo de fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos bien en formato directo o indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), sándwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de Western blot. Los antígenos y anticuerpos de la invención pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para aislar células específicamente unidas a ellos. Los ejemplos de vehículos muy conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Existen muchas etiquetas y procedimientos de etiquetado diferentes conocidos para los expertos en la materia. Los ejemplos de los tipos de etiquetas que pueden usarse en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véanse también las realizaciones descritas anteriormente en el presente documento.

Mediante una realización adicional, las moléculas de unión, en particular anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en un procedimiento para el diagnóstico de un trastorno en un individuo obteniendo una muestra de fluido corporal del individuo ensayado que puede ser una muestra de sangre, una muestra linfática o cualquier otra muestra de fluido corporal y poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno. El nivel de dichos complejos se determina a continuación por procedimientos conocidos en la técnica, indicando un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra control la enfermedad en el individuo ensayado. De la misma manera, también puede usarse el antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención. De este modo, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

En este contexto, la presente invención también se refiere a medios diseñados específicamente para este fin. Por ejemplo, puede usarse una matriz basada en proteína o anticuerpos, que se carga por ejemplo con antígenos derivados de la proteína asociada a trastorno mencionada y que contiene el neopéptido con el fin de detectar autoanticuerpos que pueden estar presentes en pacientes que padecen, por ejemplo, un trastorno neurológico, en particular la enfermedad de Alzheimer, o con anticuerpos o moléculas de unión a antígeno equivalentes de la presente invención que reconocen específicamente una cualquiera de estas proteínas. Por ejemplo, la obtención de perfiles de antígenos en micromatriz de autoanticuerpos en artritis reumatoide ha sido notificada por Hueber y col., *Arthritis Rheum.* 52 (2005), 2645-2655. El diseño de inmunoensayos en micromatriz se resume en Kusnezow y col., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de unión o antígenos identificados de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico y de diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, por ejemplo, molécula de unión, anticuerpo o fragmento de unión del mismo, antígeno, polinucleótido, vector o célula de la presente invención. Asociado con dicho o dichos recipientes puede haber un folleto en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, folleto que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana. Además, o como alternativa, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para el uso en ensayos de diagnóstico apropiados. La composición, por ejemplo, kit de la presente invención es por supuesto particularmente adecuada para el diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno que está acompañado de la presencia de una proteína asociada con un trastorno como se ha definido anteriormente, especialmente amiloidosis, y en particular es aplicable para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (AD).

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en el presente documento para indicar generalmente obtener

un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de ésta y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" tal y como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, por ejemplo, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, por ejemplo, causar la regresión de la enfermedad.

Además, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, que necesita tratamiento para una afección, trastorno o enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse de acuerdo con procedimientos muy conocidos en la técnica; véase por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) por la University of Sciences en Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse por procedimientos convencionales muy conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede realizarse por diferentes vías, por ejemplo, por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Las formulaciones en aerosol tales como formulaciones por pulverización nasal incluyen soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Dichas formulaciones se ajustan preferentemente a un pH y estado isotónico compatibles con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio con un vehículo adecuado.

Además, mientras la presente invención incluye el procedimiento ahora estándar (aunque afortunadamente infrecuente) de perforar un pequeño agujero en el cráneo para administrar un fármaco de la presente invención, en un aspecto preferido, la molécula de unión, especialmente anticuerpo o fármaco basado en anticuerpo de la presente invención puede cruzar la barrera hematoencefálica, lo que permite la administración intravenosa u oral.

El régimen de dosificación será determinado por el médico responsable y factores clínicos. Como es muy conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área corporal superficial, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administran simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1.000 μg (o de ácido nucleico para la expresión o para la inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, se consideran las dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. Generalmente, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.) del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 1-10 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén en el alcance de la invención. Dichas dosis pueden administrarse a los sujetos diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquier otro esquema determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar conlleva la administración en dosificaciones múltiples durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales conllevan la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los esquemas de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos procedimientos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está en los intervalos indicados. El progreso puede monitorizarse por evaluación periódica. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Además, la composición

farmacéutica también puede formularse como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti-A β para inmunización pasiva.

Además, puede ser deseable la co-administración o administración secuencial de otros agentes. Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad del ingrediente activo suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y toxicidad de dichos compuestos pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DL₅₀/DE₅₀. Preferentemente, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para restaurar el comportamiento y/o las propiedades cognitivas normales en el caso de la enfermedad de Alzheimer.

Éstas y otras realizaciones se describen y están abarcadas por la descripción y los ejemplos de la presente invención. La bibliografía adicional que se refiere a uno cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos que se van a emplear según la presente invención puede obtenerse de bibliotecas y bases de datos públicas, usando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública "Medline", que está organizada por el National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine en el National Institutes of Health. Las bases de datos adicionales y direcciones de internet, tales como aquellas del European Bioinformatics Institute (EBI), que es parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) son conocidas para el experto en la materia y también pueden obtenerse usando motores de búsqueda de internet. Una visión global de la información de patentes en biotecnología y una visión general de fuentes relevantes de información de patentes útil para una búsqueda retrospectiva y para percatación actual se proporciona en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

La descripción anterior describe generalmente la presente invención. A no ser que se indique otra cosa, a un término según se usa en el presente documento se le proporciona la definición según se proporciona en el Diccionario de Oxford de Bioquímica y Biología Molecular, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reeditado en 2003, ISBN 0 19 850673 2. A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. Las citas bibliográficas completas pueden encontrarse al final de la especificación inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Puede obtenerse una comprensión más completa por referencia a los ejemplos específicos siguientes que se proporcionan en el presente documento sólo para propósitos de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

35 EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención, pero no debe considerarse que limitan el alcance de la invención de ninguna manera. Las descripciones detalladas de los procedimientos convencionales, tales como los empleados en la presente memoria pueden encontrarse en la bibliografía citada; véase también "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Decimoséptima Ed. ed por Beers y Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Para una elaboración adicional de técnicas generales útiles en la práctica de esta invención, el médico puede consultar libros de texto estándar y revisiones en biología celular y cultivo tisular; véanse también las referencias citadas en los ejemplos. Los procedimientos generales en bioquímica molecular y celular pueden encontrarse en libros de texto estándar tales como Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Sambrook y col., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. (Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames y Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames y Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney y Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller y Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (Ausubel y col., eds.); y Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu y col., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag y col., John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner y col., eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplit y Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic

- Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle y Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genética mencionados en esta descripción están disponibles de proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich y ClonTech. Las técnicas generales en cultivo celular y la recogida de medios se plantean en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu y col., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch y col., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA Arrays, Herzel y col., CHAOS 11 (2001), 98-107.
- 10 Los experimentos siguientes se ilustran y describen respecto al anticuerpo NI-101.11. Sin embargo, el anticuerpo NI-101.12F6A es estructuralmente similar y puede esperarse, por lo tanto, que proporcione resultados comparables.

Procedimientos suplementarios

15 ELISA

Se recubrieron microplacas de 96 pocillos de mitad de área (Corning) con péptido Abeta sintético a una concentración estándar de 1 µg/ml en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,42) durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron y los sitios de unión no específica se bloquearon durante 1h a TA con PBS que contenía BSA al 2% (Sigma, Buchs, Suiza). Se transfirió medio condicionado de células B de placas de cultivo de células B de memoria a las placas de ELISA y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La unión de los anticuerpos humanos se determinó usando anticuerpos policlonales anti-IgG humana de burro conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Reino Unido) seguido de la medida de la actividad HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

25

Clonación molecular de anticuerpos que presentan la especificidad de interés

Se recogen células B vivas de cultivos de células B de memoria seleccionados usando un separador celular. Se prepara ARNm y se obtienen las secuencias de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina usando cebadores específicos de marco de Ig para todas las familias marco 1 (FR1) de cadena pesada y ligera variables humanas como cebadores 5' en combinación con cebadores específicos para todos los segmentos J-H humanos como cebadores 3' (Marks y col., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597). Como alternativa, puede usarse RT-PCR de célula única de células separadas únicas del cultivo de células B de memoria como fuente de secuencias de cadena pesada y ligera de Ig (Babcock y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93 (1996), 7843-7848; Brezinschek y col., J. Immunol. 155 (1995), 190-202; Coronella y col., Nucleic Acids Research 28 (2000); Owens y col., J. Immunol. 171 (2003), 2725-2733). La separación de células únicas conserva el emparejamiento correcto de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina de los clones de anticuerpo producidos originalmente en el cultivo de células B.

La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se realiza por re-cribado en micromatriz tisular compatible con microtitulación y ELISA después de la expresión recombinante de los anticuerpos completos. La expresión recombinante de los anticuerpos IgG1 completos se consigue después de la inserción de las secuencias variables de cadena pesada y ligera "en el marco de lectura correcto" en los vectores de expresión que complementan la secuencia de región variable con una secuencia que codifica un péptido señal en el extremo 5-prima y en el extremo 3' con una secuencia que codifica el o los dominios constantes apropiados. Para este fin, los cebadores contenían sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de las secuencias variables de cadena pesada y ligera en vectores de expresión de anticuerpos. La inmunoglobulina de cadena pesada se expresa insertando el producto de RT-PCR de cadena pesada de inmunoglobulina en marco en un vector de expresión de cadena pesada que porta un péptido señal y los dominios constantes de inmunoglobulina humana. La inmunoglobulina de cadena ligera kappa se expresa insertando el producto de RT-PCR de cadena ligera kappa en marco en un vector de expresión de cadena ligera que proporciona un péptido señal y el dominio constante 1 de la inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana. Como alternativa, la inmunoglobulina de cadena ligera lambda se expresa insertando el producto de RT-PCR de la cadena ligera lambda en marco en un vector de expresión de cadena ligera lambda que proporciona un péptido señal y el dominio constante 1 de la inmunoglobulina de cadena ligera lambda humana.

55

Los anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales se obtienen después de la co-transfección en células HEK 293 (o cualquier otra línea celular receptora apropiada) de un vector de expresión de cadena pesada de Ig y un vector de expresión de cadena ligera kappa o lambda de Ig. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se purifica posteriormente del medio acondicionado usando una purificación en columna con Proteína A estándar. El anticuerpo monoclonal humano recombinante puede producirse en cantidades ilimitadas usando células

60

transfectadas temporalmente o de manera estable. Las líneas celulares que producen el anticuerpo monoclonal humano recombinante pueden establecerse usando los vectores de expresión de Ig directamente o re-clonando las regiones variables de Ig en vectores de expresión diferentes. Los derivados tales como F(ab), F(ab)₂ y scFv también pueden generarse a partir de estas regiones variables de Ig.

5

Protocolo experimental:

RT-PCR de células B en masa

10 Las células vivas según se identificaron por sus propiedades de dispersión de la luz frontal y lateral de cultivos de células B de memoria seleccionados se separaron en alícuotas de 100-2.000 células directamente en tubos de PCR de 0,2 ml llenos con 20 µl de RNAlater (Ambion, Huntingdon, Reino Unido) usando un separador celular MoFlo. Se preparó ARNm usando el Micro Kit mRNA-Direct (Dyna, Invitrogen, Basilea, Suiza). Se preparó ADNc usando el Kit "RT para PCR" (Clontech Becton Dickinson, Basilea, Suiza) y la PCR de las secuencias variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina (Ig) se realizó usando el Kit de PCR Advantage 2 (Clontech) usando cebadores específicos para todas las familias de marco 1 (FR1) de cadena variable pesada y ligera humana como cebadores 5' en combinación con cebadores específicos para los dominios constantes de cadenas pesadas de Ig humana o ligeras kappa de Ig o ligeras lambda de Ig como cebadores 3'. Los cebadores se adquirieron en Microsynth (Balgach, Suiza).

20

Un péptido señal que se usó en todos los vectores de expresión se obtuvo de la secuencia de la familia 1 L5 de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana (MDMRVPAQLLGLLLLWFGSRC; SEQ ID NO: 2) como se describe en la V-Base y diseñado para proporcionar el sitio de restricción Xba 1 con el fin de facilitar la clonación de las regiones variables amplificadas por PCR

25 ATGGACATGCGGGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCTAGATGC; SEQ ID NO: 1). Xba1 se introdujo por mutagénesis silenciosa. Como un sitio de restricción 3' usado para la clonación de las regiones variables de cadena pesada, se introdujo el sitio de restricción Sal1 en C1 de IgG1 proporcionado por el vector. De manera similar, se introdujo el sitio de restricción BsiW1 en C1 de la cadena ligera kappa y se introdujo Xho1 en C1 de la cadena ligera lambda. La digestión por restricción de los productos de PCR y el ligamiento en vectores receptores se realizó según procedimientos estándar. Se preparó ADN plasmídico usando kits estándar (Qiagen, Hombrechtikon, Suiza). Los vectores receptores contenían un promotor CMV para la expresión de los genes de anticuerpo en células de mamífero.

30

Expresión de anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales

35

Los anticuerpos pueden producirse en cantidades suficientes por expresión recombinante usando tecnologías conocidas en la técnica (Trill y col., Curr. Opin. Biotechnol. 6 (1995), 553-601). El anticuerpo monoclonal humano recombinante de hasta 1 mg se produjo después de la transfección transitoria de células 293 HEK. El anticuerpo monoclonal humano recombinante de hasta 100 mg se produjo después de la transducción estable de células 293 HEK o las células NSO murinas usando vectores de lentivirus recombinantes.

40

Producción a pequeña escala de anticuerpo humano recombinante por transfección transitoria

El vector de cadena pesada de Ig y los vectores de cadena ligera de Ig se co-transfectaron en células HEK 293 usando el procedimiento estándar de co-precipitación con fosfato de calcio. Los anticuerpos recombinantes se purificaron del medio condicionado por células transfectadas HEK 293 usando purificación en columna con proteína A (GE-Healthcare, Otelfingen, Suiza).

45

Producción a gran escala de anticuerpo humano recombinante por transducción estable

50

En este contexto, se empleó un sistema de transfección basado en lentivirus para generar líneas celulares transducidas de manera estable que producen anticuerpo humano recombinante (Zufferey y col., J. Virol. 72 (1998), 9873-9880). Las células HEK 293 se co-transdujeron con dos lentivectores diferentes uno que porta un casete de expresión para la cadena pesada de Ig, el otro un casete para la cadena ligera de Ig de un anticuerpo recombinante.

55

Este procedimiento de transducción puede usarse en una amplia gama de líneas celulares de mamífero tales como células CHO y NSO.

Validación en modelos de ratón transgénico de enfermedad humana

60 Se generaron ratones transgénicos como se ha descrito previamente (Knobloch y col., Neurobiol. Aging 28 de julio

(2006)) en un fondo híbrido de C57B1/6 y DBA2. El grupo de ensayo se retrocruzó una vez a C57B1/6. Los ratones se mantuvieron en condiciones de estabulación estándar en un ciclo reverso de 12h:12h de luz/oscuridad y tuvieron acceso libre a alimento y agua. Los grupos de tratamiento se equilibraron para edad (24 meses en el primer ensayo, 26 meses en el 2º ensayo) y sexo. Los ratones se trataron con anticuerpos (3 mg/kg de peso corporal) por inyecciones intraperitoneales una vez a la semana durante un periodo de tiempo de 2 meses dando como resultado 8 inyecciones por animal.

Ensayo de comportamiento en el laberinto en Y

10 La proporción de alternancia espontánea se evalúa usando un laberinto de plástico con forma de Y, con tamaños de brazo de 40 x 20 x 10 cm. Durante las sesiones de 5 min, se registran las secuencias de las entradas al brazo; la alternancia se definió como entradas sucesivas en los tres brazos, en conjuntos de tripletes superpuestos. El porcentaje de alternancia se calculó como la proporción de alternancias reales a posibles. Después de 2 meses de tratamiento con el anticuerpo, los ratones se reensayan en el laberinto en Y. Los experimentadores se mantienen siempre ciegos para ambos tratamientos y genotipos durante todo el experimento.

Penetración de la barrera hematoencefálica y unión a estructuras anormales en el cerebro

20 Para evaluar si los anticuerpos seleccionados o fragmentos de los mismos pueden penetrar la barrera hematoencefálica y unirse a sus dianas proteicas anormalmente agregadas o conformacionalmente alteradas en el cerebro, se administró una dosis eficaz del anticuerpo por vía sistémica, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intranasal a un animal transgénico que se caracteriza por la acumulación no fisiológica de la diana proteica agregada o conformacionalmente alterada en el cerebro. La unión del anticuerpo a las estructuras patológicas específicas en el cerebro se evalúa por inmunotinción con un anticuerpo secundario anti-Ig humana etiquetado, seguido de detección inmunohistoquímica estándar.

Protocolo experimental:

30 Los ratones del modelo transgénico PS-1/APPswe para la enfermedad de Alzheimer recibieron dos inyecciones periféricas de 150 µg de NI-101.11 el día 1 y el día 3. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la segunda inyección y se perfundieron con PBS. Los cerebros se congelaron y se prepararon secciones de tejido del tejido congelado usando un criotomo. La presencia de anticuerpo humano en las secciones de criostato se ensayó tiñendo con anticuerpo anti-IgG humana marcado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, Reino Unido). La localización de las placas amiloides se realizó co-tiñendo las secciones de criostato con el anticuerpo de control específico de Abeta murino 6E10 (disponible en Covance, Número de Catálogo SIG-39320) seguido de anticuerpo anti IgG de ratón marcado con FITC. Como alternativa, sólo se usó la tinción con anticuerpo anti IgG humana marcado con Cy3. El análisis de fluorescencia se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica).

Reducción de la patología cerebral

40 Los efectos del tratamiento con anticuerpo sobre los niveles de dianas proteicas agregadas o conformacionalmente alteradas en el cerebro se evalúa por el tratamiento sistémico o administración cerebral dirigida del anticuerpo (intracraneal, intratecal o intraventricular) y un anticuerpo de control no relacionado a animales transgénicos con acumulación no fisiológica característica de la diana proteica agregada o conformacionalmente alterada en el cerebro. Los efectos del tratamiento se evalúan por inmunotinción o tinción histoquímica de las dianas proteicas alteradas o agregadas y midiendo el área cubierta por dichos agregados, tamaño del agregado y número de agregados y cuantificación bioquímica de las concentraciones de las dianas proteicas en diferentes áreas cerebrales.

50 Ausencia de efectos secundarios relacionados con el tratamiento con anticuerpo

Los efectos adversos potenciales relacionados con la diana del tratamiento con anticuerpo se evaluarán por la administración sistémica o administración cerebral dirigida del anticuerpo (intracraneal, intratecal o intraventricular) y un anticuerpo de control no relacionado a animales transgénicos con acumulación no fisiológica característica de la diana proteica agregada o conformacionalmente alterada en el cerebro. Los efectos secundarios potenciales se evaluarán por la inmunotinción o tinción histoquímica (por ejemplo, azul de Prusia para microhemorragias, hemotoxilina-eosina, leucocitos activados) y cuantificación bioquímica (por ejemplo, niveles de citoquinas por ELISA).

60 Tinción con inmunofluorescencia de células vivas

Las células HEK 293 se transfectaron de manera temporal con un vector que expresa APP humano de tipo silvestre fusionado en el extremo C terminal intracelular con la variante de proteína fluorescente amarilla Citrina. 24 horas después de la transfección, las células se incubaron con anticuerpos humanos recombinantes o anticuerpos de control a 4°C durante 30 minutos. Después de una etapa de lavado, las células se fijaron y se detectó el anticuerpo unido a la superficie usando anticuerpos secundarios etiquetados con Cy3 contra IgG humana o de ratón (Jackson ImmunoResearch). El análisis de la fluorescencia se realizó en un microscopio confocal (Leica).

Preparación de fibrillas de Abeta

El péptido Abeta se adquirió en Bachem (Bubendorf, Suiza). El péptido liofilizado se reconstituyó en TFA y se resuspendió en PBS inmediatamente antes de su uso como Abeta monomérico en los ensayos. Las fibrillas de Abeta se prepararon por incubación del péptido Abeta1-42 monomérico a una concentración de 100 µg/ml en PBS a 37°C durante 24 h. El péptido Abeta monomérico y las preparaciones de fibrillas también se usaron como sustrato para recubrir placas de ELISA.

Western blot

El péptido Abeta monomérico se mezcló con colorante de carga, se desnaturalizó con calor y se cargaron 0,2 µg por carril y se separó en una SDS-PAGE en gradiente. Las transferencias se incubaron con anticuerpo primario durante 2 h. La unión del anticuerpo monoclonal humano primario o anticuerpo control de ratón 6E10 se reveló usando anticuerpos secundarios anti-humano o anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). Los blots se desarrollaron usando Sustrato de Máxima Sensibilidad SuperSignal West Femto (Pierce, Fisher Scientific, Wohlen, Suiza).

Competencia para la unión a placas amiloides tisulares

El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 se incubó durante 2 h con preparaciones de péptido Abeta. Las preparaciones de anticuerpo/Abeta se usaron para la tinción inmunohistoquímica de sección de cerebro obtenida de un paciente con enfermedad de Alzheimer confirmada neuropatológicamente. Se prepararon crio-secciones de 5 µm, se bloquearon con BSA al 4%, suero de cabra al 5% y suero de caballo al 5% en PBS durante 1 h a TA y se tiñeron con preparaciones NI-101.11/Abeta durante 1 h a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado, se analizó la unión de los anticuerpos humanos a las secciones tisulares usando anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 contra IgG humana (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). El análisis de la fluorescencia se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica, Heerbrugg, Suiza).

Ejemplo 1

Detección de anticuerpos humanos contra estructuras anormales predominantes en enfermedades cerebrales humanas

Se ensayaron anticuerpos de sujetos fenotípicamente sanos o pacientes excepcionalmente estables clínicamente con enfermedad de Alzheimer por inmunohistoquímica en secciones cerebrales obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente. La figura 1A demuestra la presencia de anticuerpos en un paciente excepcionalmente estable clínicamente que se unen a placas beta-amiloides según se confirmó por co-tinción con un anticuerpo conocido contra beta-amiloide humana (anticuerpo 4G8; figura 1B). La presencia en un sujeto humano sano de anticuerpos contra ovillos neurofibrilares en una sección de tejido obtenida de un paciente con enfermedad de Alzheimer se muestra en la figura 2A. Este resultado se confirmó por co-tinción con un anticuerpo conocido contra tau humano (HT7). La figura 3A revela la presencia en un sujeto humano sano de anticuerpos contra neuritas distróficas en una sección de tejido obtenida de un paciente con enfermedad de Alzheimer. La tinción de control con un anticuerpo conocido contra tau humano (HT7) se representa en la figura 3B. Estos resultados demuestran la presencia en pacientes fenotípicamente sanos o excepcionalmente estables clínicamente de anticuerpos contra estructuras patológicas identificables en muestras de tejido humano con diagnósticos confirmados histopatológicamente.

Ejemplo 2

Los anticuerpos humanos recombinantes mantienen la especificidad frente a una estructura anormal *in vivo* y reconocen el epitopo conformacional de proteína beta-amiloide asociada con enfermedad en placas amiloides cerebrales pero no el precursor fisiológico o derivado no patógeno de ésta

El anticuerpo NI-101.11 se obtuvo de pacientes con enfermedad de Alzheimer excepcionalmente estables clínicamente con una proporción significativamente reducida de deterioro cognitivo. El aislamiento y la producción recombinante de anticuerpos se realizaron como se especifica en los procedimientos suplementarios.

5

NI-101.11

Se ensayó NI-101.11 recombinante para unión a placas beta-amiloides cerebrales (figura 4). Se tiñeron secciones cerebrales obtenidas de un paciente con enfermedad de Alzheimer confirmada neuropatológicamente a las concentraciones indicadas. La unión del anticuerpo a placas beta-amiloides con concentraciones de 50 pM sugiere una unión de alta afinidad. La unión del anticuerpo NI-101.11 a placas beta-amiloides a una concentración de 0,5 nM no se ve afectada por competencia por la adición de cantidades en exceso de polipéptido derivado de Abeta N-terminal lineal sintético que representa las posiciones 1 a 16 a concentraciones de hasta 1 μ M (figura 5). Además, la unión de NI-101.11 a placas beta-amiloides en secciones cerebrales a concentración 8 nM se ve afectada por competencia por cantidades en exceso de fibrillas de Abetal-42 (4 μ M) pero no de monómeros de Abetal-42 lineal sintético a concentración 4 μ M, lo que sugiere que NI-101.11 reconoce un epítipo conformacional que no está presente en Abeta monomérico (figura 6).

Para evaluar adicionalmente la unión del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a Abeta monomérico lineal sintético, se separaron preparaciones de Abeta monomérico por PAGE no desnaturalizante. La proteína transferida se ensayó con anticuerpo humano recombinante NI-101.11 y un anticuerpo de control contra secuencias Abeta N-terminal lineal (6E10). Mientras que 6E10 produjo una tinción prominente del péptido Abeta monomérico, no se detectó ninguna unión para NI-101.11 lo que sugiere que NI-101.11 no se une al péptido Abeta monomérico lineal, sino que reconoce un epítipo conformacional de Abeta (figura 7).

25

La unión de NI-101.11 recombinante a fibrillas amiloides artificiales preparadas a partir de péptidos Abetal-42 sintéticos y Abeta monomérico se determinó por ELISA (figura 8). Las fibrillas de Abeta sintético o Abeta monomérico utilizadas para recubrir placas ELISA a densidades de recubrimiento iguales se incubaron con NI-101.11 a las concentraciones indicadas. La unión a fibrillas amiloides artificiales (cuadrados abiertos) es más de 100 veces mayor en comparación con Abeta monomérico (cuadrados llenos). El anticuerpo de control 22C4 contra el extremo C de Abeta se une preferentemente a Abeta monomérico (círculos llenos) y menos bien a las fibrillas (círculos abiertos). Esto sugiere que NI-101.11 reconoce un epítipo conformacional que también está presente en las fibrillas amiloides artificiales preparadas a partir de péptidos Abeta sintéticos.

La reactividad cruzada del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 contra APP celular de longitud completa o con cualquiera de sus derivados fisiológicos se determinó por ensayos de unión celular (figura 9).

Se incubaron células HEK 293 vivas que expresan de manera estable APP humana fusionada con Citrina como un marcador durante 30 min a 4°C, para evitar la internalización, con el anticuerpo humano recombinante NI-101.11 o el anticuerpo control 6E10 contra la secuencia Abeta N-terminal lineal. Las señales positivas para citrina indican las células que expresan APP. A diferencia del anticuerpo de control (6E10) que se une a APP de la superficie celular en todas las células que expresan la construcción de fusión, no se detecta ninguna unión de anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a APP de longitud completa. Estos datos demuestran la ausencia de reactividad cruzada de NI-101.11 con APP celular, fisiológica.

45

La ausencia de unión de NI-101.11 a Abeta monomérico se demostró adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño: No se observó ninguna unión de NI-101.11 o un anticuerpo control no relacionado a Abetal-42 monomérico etiquetado con FITC (figura 10A, 10B). Por el contrario, el anticuerpo 22C4 dirigido contra un epítipo lineal presente en el extremo C de Abeta co-eluyó con los monómeros Abetal-42-FITC (figura 10C).

50

En un ELISA de competencia, la unión de 6E10, un anticuerpo dirigido contra un epítipo lineal en el extremo N de Abeta, podía bloquearse completamente después de una pre-incubación con concentraciones en exceso de péptidos monoméricos Abetal-16, Abetal-28 y Abetal-40. Por el contrario, la pre-incubación con concentraciones en exceso de péptidos Abeta lineales no suprimió la unión de NI-101.11, lo que sugiere que NI-101.11 requiere un epítipo conformacional (figura 11).

55

Ejemplo 3

El anticuerpo humano recombinante contra beta-amiloides cerebral cruza la barrera hematoencefálica en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer y se une a placas beta-amiloides cerebrales *in vivo*

60

Para determinar si el anticuerpo humano recombinante NI-101.11 cruza la barrera hematoencefálica y se une a placas beta-amiloides cerebrales *in vivo*, los ratones del modelo de la enfermedad de Alzheimer PS-1/APPswe recibieron dos inyecciones periféricas de 150 µg de NI-101.11 el día 1 y el día 3. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la segunda inyección y se perfundieron con PBS. Los cerebros se recogieron y se tiñeron secciones cerebrales con anticuerpos marcados con FITC contra IgG humana o con el anticuerpo Abeta monoclonal de ratón 6E10 seguido de un anticuerpo marcado con FITC contra IgG de ratón para confirmar la presencia de placas beta-amiloides cerebrales. La tinción intensa de las placas amiloides con anti-IgG humana indicó que el anticuerpo humano recombinante NI-101.11 puede cruzar la barrera hematoencefálica de ratones transgénicos y unirse a las placas beta-amiloides cerebrales en animales vivos (figura 15).

Ejemplo 4

El anticuerpo humano recombinante contra beta-amiloide mejora el comportamiento cognitivo anormal y confiere una reducción de la carga de placas beta-amiloides, astrogliosis y microgliosis en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer sin incrementar la frecuencia de microhemorragias

Se trataron ratones arcAbeta de 24 meses de edad y miembros de su camada de tipo silvestre con edad equivalente semanalmente i.p. con 3 mg/kg de anticuerpo humano recombinante NI-101.11 o un anticuerpo de control humano con isotipo equivalente durante 2 meses. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre el comportamiento anormal en los ratones transgénicos, se realizó un ensayo comportamental de laberinto en Y antes y después de la finalización del tratamiento. La proporción espontánea de alternancia se evaluó usando un laberinto de plástico con forma de Y, con tamaños de brazo de 40 x 20 x 10 cm. Durante las sesiones de 5 min, se registraron las secuencias de entradas en los brazos; la alternancia se definió como entradas sucesivas en los tres brazos, en conjuntos de tripletes superpuestos. El porcentaje de alternancia se calculó como la proporción de alternancias reales a posibles (definida como el número total de entradas a brazos - 2) multiplicada por 100%. El rendimiento en el laberinto en Y de ratones arcAbeta no tratados y controles de miembros de su camada de tipo silvestre se comparó usando un ensayo de t para datos no emparejados. El ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis se usó para comparar la mejora después del tratamiento en los 4 grupos. El ensayo no paramétrico de Mann-Whitney U se eligió para la comparación por pares de los diferentes grupos. Los participantes con cero (es decir, ratones que no dejaron el brazo en el que se pusieron) se excluyeron del análisis.

Como se observó en estudios previos, los ratones arcAbeta de 24 meses de edad no tratados estuvieron significativamente discapacitados en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre (figura 16A, antes del tratamiento; ensayo t para datos no emparejados, $p = 0,0007$).

Los ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 mostraron niveles de alteración claramente potenciados, comparables con los ratones de control de tipo silvestre tratados con NI-101.11 después de 2 meses de tratamiento. El análisis de la mejoría (es decir, rendimiento después del tratamiento menos rendimiento antes del tratamiento) mostró una diferencia significativa entre los cuatro grupos (figura 16B, ensayo de Kruskal-Wallis; $p = 0,03$). Un análisis post-hoc por pares entre todos los grupos mostró que los ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 mejoraron su rendimiento cognitivo significativamente más que los ratones de tipo silvestre (Mann-Whitney U; $p = 0,05$ NI-101.11 tg frente a NI-101.11 wt; $p = 0,008$ NI-101.11 tg frente a control wt). Este grupo de ratones también mostró una tendencia fuerte hacia un rendimiento mejorado en comparación con sus compañeros de camada transgénicos tratados con el anticuerpo de control (Mann-Whitney-U; $p = 0,08$ NI-101.11 tg frente a control tg). Todos los ratones mostraron una mejoría de ~10% en el rendimiento en el re-ensayo, lo que se debió probablemente al entorno familiar de la tarea.

Los efectos del tratamiento crónico de 2 meses con NI-101.11 sobre la carga amiloide, astrogliosis y microgliosis se analizaron por análisis histoquímico e inmunohistoquímico cuantitativos. Para este fin, los ratones se anestesiaron después de la finalización del ensayo comportamental y se perfundieron por vía transcardial con PBS. Un hemisferio cerebral se fijó en paraformaldehído al 4% y se incluyó en parafina. Se cortaron secciones sagitales de 5 µm con un microtomo Leica RM 2135 (Bannockburn, Illinois). La carga de placas beta-amiloides en la corteza y el hipocampo se cuantificó en secciones de cerebro teñidas con Tioflavina S y Rojo Congo de acuerdo con el protocolo estándar. Para la inmunohistoquímica, los cortes se desparafinaron, se bloquearon con BSA al 4%, suero de cabra al 5% y suero de caballo al 5% en PBS durante 1 h a TA. Los anticuerpos se incubaron durante una noche a 4°C usando las diluciones siguientes: anti-GFAP (Advanced Immunochemicals) 1:500, anti-IBA1 (WAKO) 1:500. Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo se incubaron a TA durante 2 h. Se usaron 2-3 secciones por cerebro de ratón espaciadas 75 µm entre sí para cada tinción. Se tomaron 2 imágenes por sección a un aumento de 10x para el análisis de la corteza (región parietal y frontal). El área completa del hipocampo (aumento de 5x ajustado a la ROI) se tomó para el análisis del hipocampo. El análisis de imágenes automático se realizó con el software ImageJ.

La tinción doble de las secciones cerebrales de ratones arcAbeta inmunizados con 6E10 y anti-IgG humana revelaron la unión de NI-101.11 a depósitos de Abeta (figura 17, panel izquierdo), lo que indica que NI-101.11 puede cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a placas beta-amiloides cerebrales. No se observó esta unión del anticuerpo humano a depósitos de Abeta en los ratones arcAbeta tratados con anticuerpo de control (figura 17, panel derecho).

[0317] El tratamiento crónico con 3 mg/kg de NI-101.11 dio como resultado una reducción significativa de la carga de placas amiloides como se reveló por la tinción con Tioflavina S y Rojo Congo. Esta reducción alcanzó niveles de más del 50% en la corteza e hipocampo en comparación con los ratones arcAbeta tratados con anticuerpo de control (figura 18A, B). Además del área de la placa (figura 18C), también se observaron reducciones significativas para el número de placas (figura 18D) y el tamaño medio de las placas (figura 18E).

Para ensayar si el tratamiento crónico con NI-101.11 afecta a la respuesta neuroinflamatoria en los ratones arcAbeta, se cuantificaron los astrocitos reactivos y microglia después de la tinción inmunohistológica. Se observó una reducción en el número de astrocitos reactivos (tinción anti-GFAP) en la corteza de los ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 en comparación con los animales tratados con el anticuerpo de control (figura 19A; Mann-Whitney-U; $p=0,047$). No se detectó ningún cambio en el hipocampo. La tinción con un anticuerpo contra un marcador de microglia y macrófagos (anti-Iba1) también reveló una tendencia estadística hacia inflamación reducida (figura 19B; Mann-Whitney-U; $p=0,075$ tanto para corteza como para hipocampo). La disminución en la astrocitosis y microgliosis está en línea con la carga beta-amiloide reducida observada después del tratamiento con NI-101.11.

La inmunoterapia pasiva con ciertos anticuerpos monoclonales dirigidos contra Abeta puede asociarse con una frecuencia incrementada de microhemorragias en el cerebro (Pfeifer y col., Science 298 (2002), 1379; Wilcock y col., J Neuroinflammation 1 (2004), 24). Para evaluar los efectos de la terapia crónica con NI-101.11, se realizó una tinción con azul de Prusia de Perl en secciones cerebrales de ratones arcAbeta y de tipo silvestre después de tratamiento crónico con NI-101.11. Esta tinción revela la presencia de hemosiderina, un producto de degradación de la hemoglobina, y marcador de microhemorragias previas (figura 20). En los ratones arcAbeta viejos tratados con un anticuerpo de control, la frecuencia de perfiles positivos para azul de Prusia estaba significativamente elevada en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre (Mann-Whitney-U; $p=0,001$). El tratamiento con NI-101.11 no dio lugar a un incremento en el número de microhemorragias cuando se compara con los ratones arcAbeta tratados con anticuerpo de control (Mann-Whitney-U; $p=0,347$) lo que indica que los efectos terapéuticos beneficiosos del tratamiento con NI-101.11 se produjeron en ausencia de este efecto secundario observado frecuentemente de inmunoterapia pasiva de Abeta.

Ejemplo 5

El anticuerpo humano recombinante contra beta-amiloide cerebral inhibe la formación de fibrillas de Abeta sintéticas *in vitro*

Se ensayó el efecto del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 sobre la formación de fibrillas Abeta midiendo la Tioflavina S unida a Abeta agregado por análisis de fluorescencia. Se incubaron soluciones de Abeta monomérico a 37°C durante 24 h en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de NI-101.11. La formación de fibrillas de Abeta sintéticas *in vitro* se inhibió por NI-101.11 humano recombinante de una manera dependiente de la concentración (figura 21).

Ejemplo 6

Efectos de NI-101.11 sobre la fagocitosis ex vivo de fibrillas de Abeta por células derivadas de microglia BV-2

Se estudiaron los efectos de NI-101.11 sobre la fagocitosis mediada por el receptor Fcgamma de fibrillas de Abeta en la línea celular derivada de microglia BV-2. Las células BV-2 se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 5%, Pen/Estrep y glutamina. Las células se tripsinizaron y se sembraron 120.000 células BV-2/pocillo en placas de 24 pocillos con el fondo plano. Después de 12 h, el medio se reemplazó por 400 μ l de DMEM/F12/pocillo suplementado con HEPES 20 mM (pH 7,3), BSA al 1%, 10 μ g/ml de Pen/Estrep. Se añadieron 100 μ g/ml de Fucoidan, un inhibidor del receptor trampa ("scavenger") 30 min antes del experimento. Se pre-incubaron fibrillas de Abeta etiquetadas con FITC 50 μ M con las concentraciones indicadas de anticuerpos durante 30 min a 37°C, se lavó dos veces, seguido de centrifugación durante 5 min a 14.000 x g. Esta suspensión se añadió a las placas de cultivo tisular. Después de 30 min, las células BV2 se lavaron dos veces con HBSS para eliminar Abeta fibrilar no asociado.

60

Las células se trataron con 250 µg/ml de tripsina/EDTA durante 20 min a 4°C y se lavaron dos veces por centrifugación a 500 x g durante 5 min a 4°C. Las células se fijaron durante 20 min en FACS-Fix (PBS, FA al 2%, Glucosa al 2%, NaN 5 mM) y se lavaron dos veces con lavado FACS (PBS, EDTA 5 µM, BSA al 0,2%). La fluorescencia (FL-1) de 10.000 células se determinó por análisis FACS (basado en Webster SD y col., JI 2001).

5

La fagocitosis dependiente del receptor Fcγ de fibrillas de Abeta1-42 etiquetadas con FITC se midió después de la inhibición del sistema de receptor trampa ("scavenger"). El análisis comparativo de NI-101.11 humano y un anticuerpo disponible en el mercado dirigido a un epítipo lineal en el extremo N del péptido Abeta (6E10) demostró una inducción dependiente de la dosis de la fagocitosis de fibrillas de Abeta. La captación de las fibrillas mediada por NI-101.11 es hasta 3 veces mayor que la observada para el anticuerpo 6E10 (figura 22). Estos datos indican que NI-101.11 desencadena una fagocitosis mediada por el receptor Fcγ potente dependiente de la dosis, de fibrillas de Abeta por las células microgliales.

10

Conclusión

15

Como se ha demostrado en los experimentos anteriores realizados de acuerdo con la presente invención, fue sorprendentemente posible detectar anticuerpos protectores y terapéuticamente activos y células B productoras de anticuerpos en sujetos humanos asintomáticos, fenotípicamente sanos, así como en pacientes con evoluciones de la enfermedad excepcionalmente estables clínicamente a pesar de un diagnóstico de discapacidad cognitiva o enfermedad de Alzheimer. Más específicamente, pudo detectarse y aislarse una nueva clase de anticuerpos humanos, que discriminan la forma fisiológicamente funcional de un antígeno, minimizando de esta manera el riesgo de efectos secundarios autoinmunógenos que era hasta ahora un problema en la inmunoterapia. De este modo, se proporcionan anticuerpos y moléculas de unión equivalentes que reconocen específicamente una variante del antígeno en una estructura patofisiológicamente relevante, a la que se supone que el anticuerpo se une con el fin de disminuir su toxicidad o para reducir su concentración o para estimular su degradación, por ejemplo, haciendo que el patógeno sea visible para los macrófagos que expresan FcR o células microgliales y, por lo tanto, volverlo inocuo. Como se ha demostrado adicionalmente en los ejemplos, dichos anticuerpos son terapéuticamente eficaces y son capaces tanto de suspender como de prevenir los efectos perjudiciales de proteínas patológicas anormales y agregados de éstas sin incrementar la frecuencia de microhemorragias cerebrales.

20

25

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zúrich

30

<120> Procedimiento para proporcionar moléculas de unión y dianas específicas de enfermedad

<130> NE30A06/P-EPD2-WO

<150> US 60/878,831

35

<151> 05-01-2007

<150> EP 07000211.8

<151> 05-01-2007

40

<150> US 60/934,291

<151> 11-06-2007

<150> EP 07020341.9

<151> 17-10-2007

45

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 66

<212> ADN

<213> Homo sapiens

55

<220>

ES 2 635 317 T3

<221> misc_feature

<222> (1)..(66)

<223> Péptido líder derivado de Vkappa I L5 humano, sitio de restricción Xba 1 introducido en 3' de la secuencia

5 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (66)

<400> 1

10

atg gac atg cgg gtg ccc gcc cag ctg ctg ggc ctg ctg ctg ctg tgg 48

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

ttc ccc ggc tct aga tgc

Phe Pro Gly Ser Arg Cys

20

66

<210> 2

<211> 22

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

20

1

5

10

15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys

20

<210> 3

<211> 372

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> región_V

30 <222> (1) .. (372)

<223> NI-101.10-secuencia de cadena pesada variable (Vh)

<220>

<221> CDS

35 <222> (1) .. (372)

<400> 3

ES 2 635 317 T3

gag	gtg	cag	cta	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	agg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcg	tct	gga	ttc	gcc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20						25					30		
ggc	ata	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtg	144
Gly	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40							45		
gca	gtt	ata	tgg	ttt	gat	gga	act	aaa	aaa	tac	tat	aca	gac	tcc	gtg	192
Ala	Val	Ile	Trp	Phe	Asp	Gly	Thr	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	
	50					55						60				
aag	ggc	aga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	aag	aac	aca	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70						75				80	
ctg	caa	atg	aac	acc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Thr	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	gat	agg	ggt	ata	gga	gct	cgg	cgg	ggg	ccg	tac	tac	atg	gac	336
Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Pro	Tyr	Tyr	Met	Asp	
			100					105						110		
gtc	tgg	ggc	aaa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca					372
Val	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120									

<210> 4

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 635 317 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> región_V

10 <222> (1) .. (372)

<223> NI-101.11-secuencia de cadena pesada variable (Vh)

<220>

<221> CDS

15 <222> (1) .. (372)

<400> 5

ES 2 635 317 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	agc	ggc	ggc	ggc	gtg	gtg	cag	ccc	ggc	cgg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
agc	ctg	cgg	ctg	agc	tgc	gcc	gcc	agc	ggc	ttc	gcc	ttc	agc	agc	tac	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20						25					30		
ggc	atg	cac	tgg	gtg	cgg	cag	gcc	ccc	ggc	aag	ggc	ctg	gag	tgg	gtg	144
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
gcc	gtg	atc	tgg	ttc	gac	ggc	acc	aag	aag	tac	tac	acc	gac	agc	gtg	192
Ala	Val	Ile	Trp	Phe	Asp	Gly	Thr	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	
	50					55						60				
aag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	agc	cgg	gac	aac	agc	aag	aac	acc	ctg	tac	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	cag	atg	aac	acc	ctg	cgg	gcc	gag	gac	acc	gcc	gtg	tac	tac	tgc	288
Leu	Gln	Met	Asn	Thr	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcc	cgg	gac	cgg	ggc	atc	ggc	gcc	cgg	cgg	ggc	ccc	tac	tac	atg	gac	336
Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Pro	Tyr	Tyr	Met	Asp	
			100					105						110		
gtg	tgg	ggc	aag	ggc	acc	acc	gtg	acc	gtg	agc	agc					372
Val	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120									

<210> 6

5 <211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

10

ES 2 635 317 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> región_V

10 <222> (1) .. (327)

<223> NI-101.10 and NI-101-11-secuencia de cadena ligera kappa variable (Vkappa)

<220>

<221> CDS

15 <222> (1) .. (327)

<400> 7

ES 2 635 317 T3

```

gaa att gtg ctg act cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
          85           90           95

act ttc ggc gga ggg acc aag ctc gag atc aaa cgt acg      327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
          100           105

```

<210> 8

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

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

```

10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

ES 2 635 317 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	agc	ggc	ccc	ggc	ctg	gtg	aag	ccc	gcc	gag	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ala	Glu	
1				5					10					15		
acc	ctg	agc	ctg	acc	tgc	acc	gtg	agc	ggc	ggc	agc	atc	cgg	agc	ggc	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Arg	Ser	Gly	
			20					25					30			
agc	atc	tgc	tgg	tac	tgg	atc	cgg	cag	ccc	ccc	ggc	aag	ggc	ctg	gag	144
Ser	Ile	Cys	Trp	Tyr	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
		35					40					45				
tgg	atc	ggc	tac	ttc	tgc	tac	agc	ggc	gcc	acc	ttc	tac	acc	ccc	agc	192
Trp	Ile	Gly	Tyr	Phe	Cys	Tyr	Ser	Gly	Ala	Thr	Phe	Tyr	Thr	Pro	Ser	
	50					55					60					
ctg	cgg	ggc	cgg	ctg	acc	atc	agc	gtg	gac	gcc	agc	aag	aac	cag	ctg	240
Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Ala	Ser	Lys	Asn	Gln	Leu	
65					70					75					80	
agc	ctg	agc	ctg	agc	agc	gtg	acc	gcc	gcc	gac	acc	gcc	gtg	tac	tac	288
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
tgc	gcc	cgg	cgg	gcc	ggc	gag	aac	agc	ggc	ggc	atc	gag	ccc	tac	tac	336
Cys	Ala	Arg	Arg	Ala	Gly	Glu	Asn	Ser	Gly	Gly	Ile	Glu	Pro	Tyr	Tyr	
			100					105					110			
ggc	atg	gac	gtg	tgg	ggc	cag	ggc	acc	acc	gtg	acc	gtg	agc	agc		381
Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125				

<210> 10

5 <211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

10

ES 2 635 317 T3

```

gac gag atc gtg ctg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc atc      48
Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile
1           5           10           15

ggc gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gcc agc gag agc atc aac aag      96
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys
           20           25           30

tac gtg aac tgg tac cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg      144
Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ser Arg Val Leu Leu
           35           40           45

atc tac gcc gcc agc agc ctg cag agc ggc gcc ccc agc cgg gtg agc      192
Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser
           50           55           60

ggc agc ggc ttc ggc cgg gac ttc agc ctg acc atc agc ggc ctg cag      240
Gly Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65           70           75           80

gcc gag gac ttc ggc gcc tac ttc tgc cag cag agc tac agc gcc ccc      288
Ala Glu Asp Phe Gly Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro
           85           90           95

tac acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aag cgg acc      330
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
           100           105           110

```

<210> 12

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys
           20           25           30

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser
           50           55           60

10 Gly Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln

```


ES 2 635 317 T3

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 14

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Arg	Arg
			20					25					30		
Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Ser	Gly	Ser	Ile	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
65					70					75					80
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Ser	Arg	Trp	Gly	Ser	Ser	Trp	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 15
 10 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 15 <221> región_V
 <222> (1)..(330)
 <223> NI-101.13-secuencia de cadena ligera lambda variable (Vlambda)

<220>
 20 <221> CDS
 <222> (1) .. (330)

<400> 15

ES 2 635 317 T3

cag agc gtg ctg acc cag ccg ccg agc gcg agc ggc acc ccg ggc cag	48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
cgc gtg acc att agc tgc agc ggc agc agc agc aac att ggc agc aac	96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn	
20 25 30	
tat gtg tat tgg tat cag cag ccg ccg ggc acc gcg ccg aaa ctg ctg	144
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
35 40 45	
att tat cgc aac aac cag cgc ccg agc ggc gtg ccg gat cgc ttt agc	192
Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
50 55 60	
ggc agc aaa agc ggc acc agc gcg agc ctg gcg att agc ggc ctg cgc	240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg	
65 70 75 80	
agc gaa gat gaa gcg gat tat tat tgc gcg gcg tgg gat gat agc ctg	288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu	
85 90 95	
agc ggc tat gtg ttt ggc acc ggc acc aaa gtg acc gtg ctg	330
Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu	
100 105 110	

<210> 16
 5 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

10

ES 2 635 317 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 17

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR1

15

<400> 17

Ser Tyr Gly Ile His
 1 5

20 <210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (1) .. (17)

ES 2 635 317 T3

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR2

<400> 18

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

5 **Gly**

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (15)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR3

20 <400> 19

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 20

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

35 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh, CDR1

<400> 20

Ser Tyr Gly Met His
1 5

40

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

50 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (17)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh,

ES 2 635 317 T3

CDR2

<400> 21

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

5 Gly

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (15)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh, CDR3

20

<400> 22

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val
 1 5 10 15

25 <210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (1) .. (11)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A Vkappa, CDR1

40 <400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 24

45 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (7)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A

Vkappa, CDR2

5

<400> 24

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

10 <210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (1) .. (9)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A

Vkappa, CDR3

25 <400> 25

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 26

30 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

40 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR1

<400> 26

Ser Gly Ser Ile Cys
1 5

45

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

55 <221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (19)

ES 2 635 317 T3

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR2

<400> 27

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
1 5 10 15

5 **Leu Arg Gly**

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (17)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR3

20 <400> 28

Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 29

25 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

35 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 V kappa, CDR1

<400> 29

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys Tyr Val Asn
1 5 10

40

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

ES 2 635 317 T3

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (7)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR2

5 <400> 30

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 31

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (9)

20 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR3

<400> 31

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

25

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (7)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR1

<400> 32

40

Arg Arg Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 33

<211> 16

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región determinante de la complementariedad (CDR)

50

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (16)

<223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR2

55

<400> 33

ES 2 635 317 T3

Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 34
 5 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (11)
 15 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR3

<400> 34

Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr
1 5 10

20
 <210> 35
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (13)
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR1

<400> 35

35
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 36
 <211> 7
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)
 45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (7)
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR2

50
 <400> 36

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

55 <210> 37

ES 2 635 317 T3

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

5 <220>
 <223> región determinante de la complementariedad (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE

10 <222> (1) .. (11)
 <223> Denominación de secuencias proteicas de CDR en la Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR3

<400> 37

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

<210> 38
 <211> 372
 <212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> región_V
 <222> (1) .. (372)

25 <223> NI-101.12F6A-secuencia de cadena pesada variable (Vh)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (372)

30

<400> 38

	cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	agg		
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg		48
	1				5					10					15			

	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcg	tct	gga	ttc	gcc	ttc	agt	agc	tat		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr		96
				20					25					30				

ES 2 635 317 T3

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg	192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac	336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp	
100 105 110	
gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca	372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 39

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

ES 2 635 317 T3

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

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 40
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> región_V
 <222> (1) .. (324)
 <223> NI-101.12F6A-secuencia de cadena ligera kappa variable (Vkappa)

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (324)

20 <400> 40

ES 2 635 317 T3

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
          85           90           95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt      324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100           105

```

<210> 41

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

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

```

ES 2 635 317 T3

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a beta-amiloide, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
5 una región variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 39; y una región variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 41.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano de isotipo IgG.
10
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano de isotipo IgG1.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera kappa humana.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un fragmento de unión a antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂.
20
6. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6.
25
8. Una célula huésped aislada que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, o dos vectores de expresión, en la que el primer vector de expresión codifica la región variable de cadena pesada y el segundo vector de expresión codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
30
9. Un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-beta-amiloide o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo dicho procedimiento
(a) cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8 en un cultivo celular; y
(b) aislar el anticuerpo anti-beta-amiloide o fragmento de unión a antígeno del mismo a partir del cultivo celular.
35
10. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo codificado por el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 u obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9.
11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las
40 reivindicaciones 1 a 5 o 10 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, disfunción cognitiva leve o acumulación o depósito anormal de beta-amiloide en el sistema nervioso central en un sujeto humano.
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por vía intravenosa, por vía
45 intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intranasal, por vía parenteral o como un aerosol.
13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 14. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 10 unido a una etiqueta detectable.
15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la etiqueta detectable es una enzima, grupo prostético, material fluorescente, material luminiscente, material bioluminiscente, material radiactivo, metal que
55 emite positrones, o ion metálico paramagnético no radiactivo.
16. La composición de acuerdo con la reivindicación 14 o 15 para uso en la detección *in vivo* de depósito de beta-amiloide en el cerebro de un sujeto humano.
- 60 17. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el depósito de beta-amiloide

se detecta mediante tomografía de emisión de positrones.

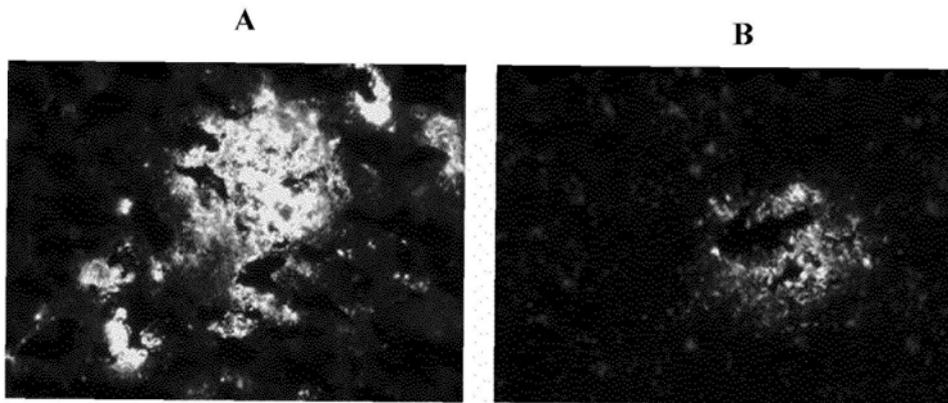


FIG. 1

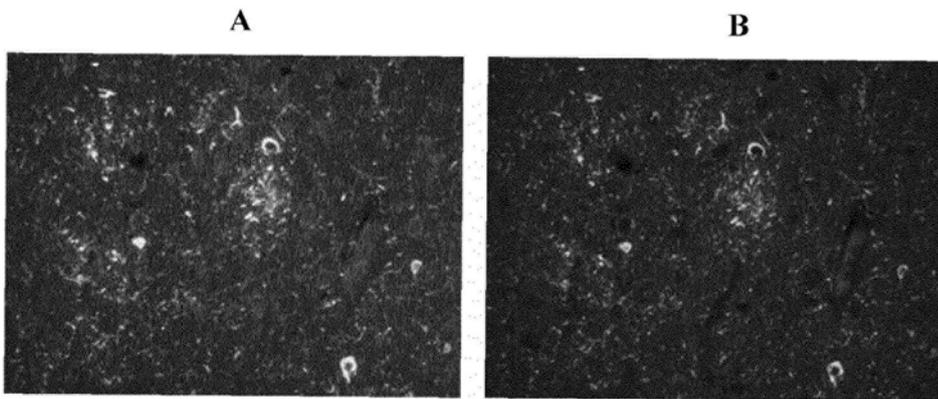


FIG. 2

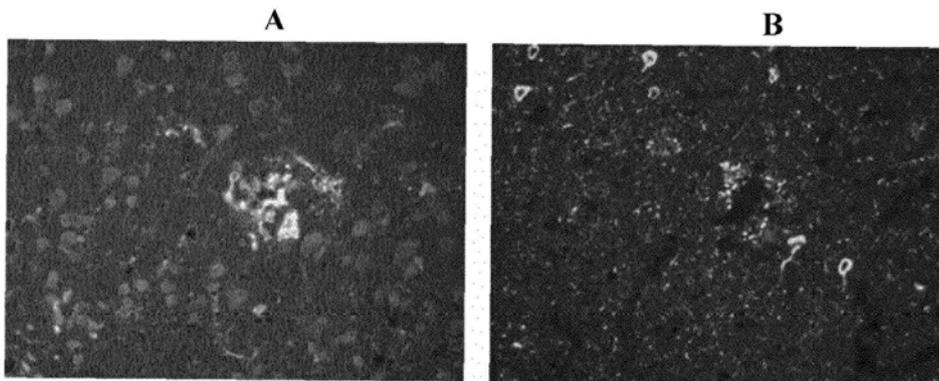


FIG. 3

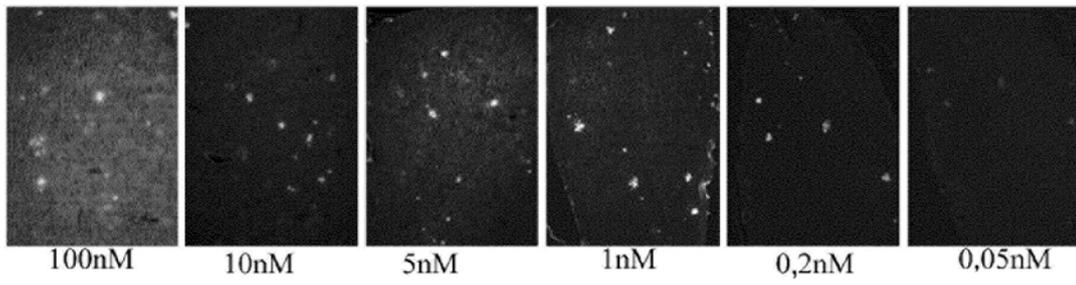


FIG. 4

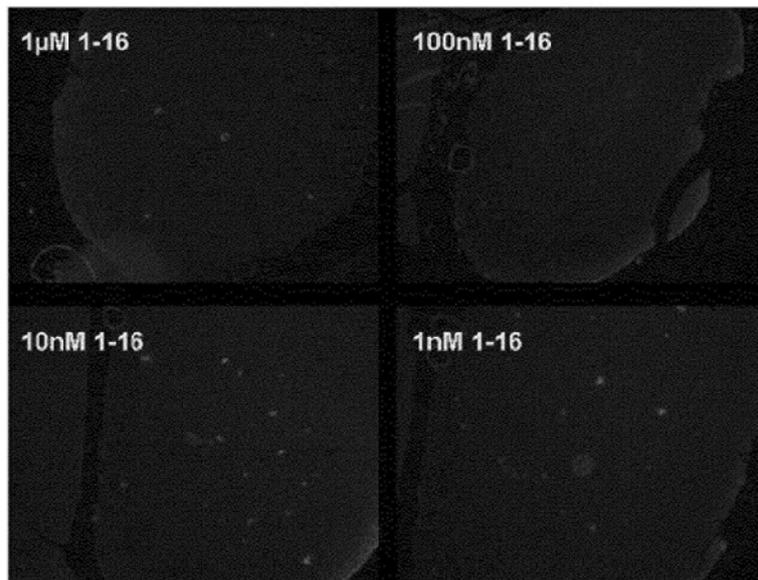


FIG. 5

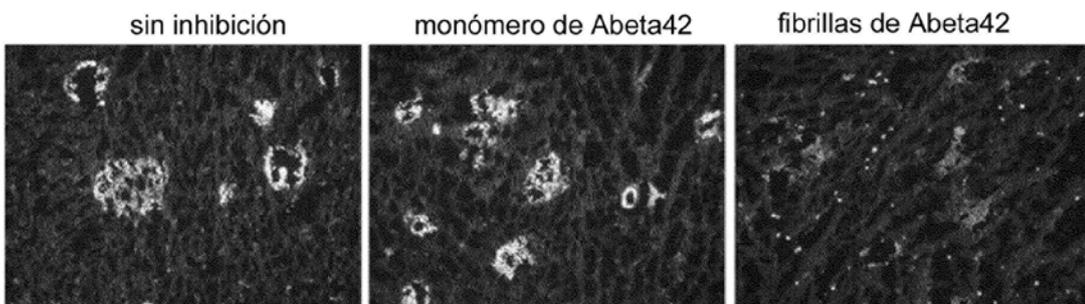


FIG. 6

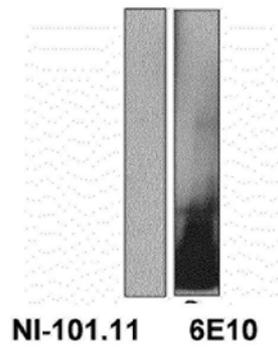


FIG. 7

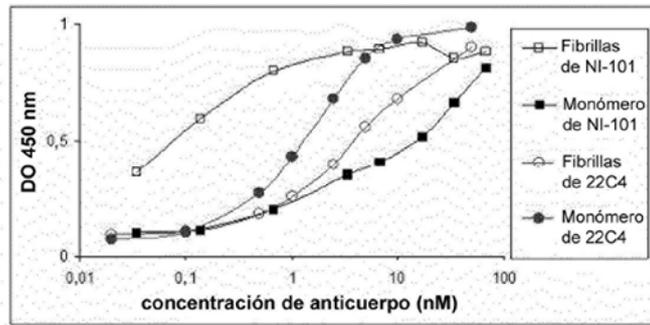


FIG. 8

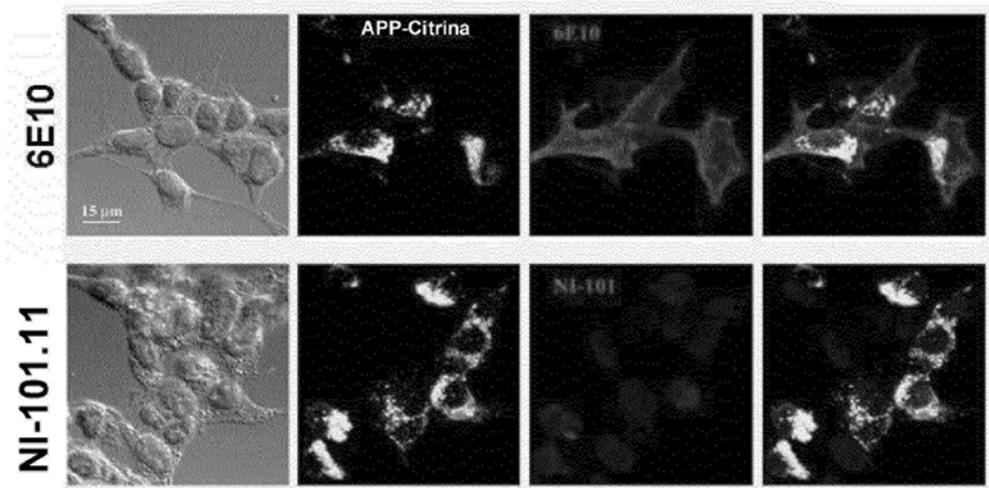


FIG. 9

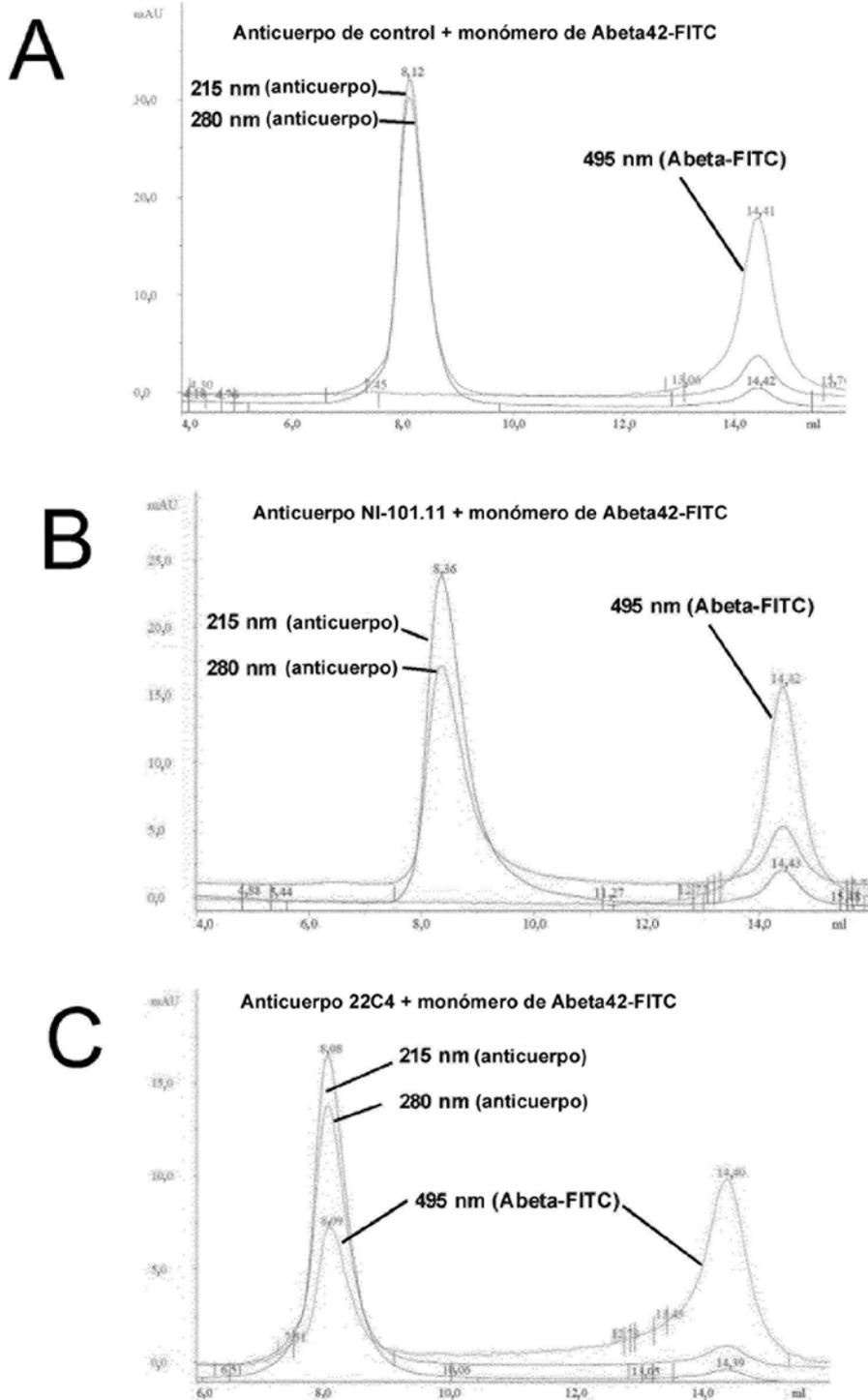


FIG. 10A-C

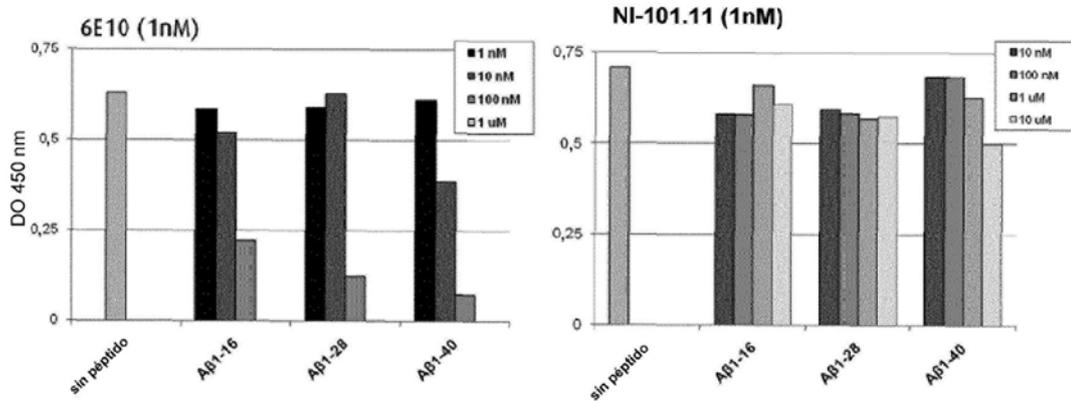


FIG. 11

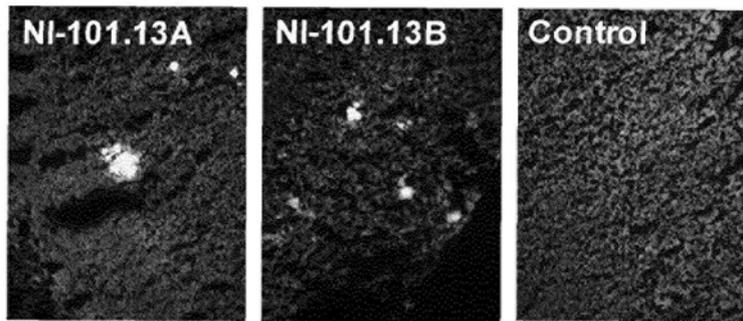


FIG. 12

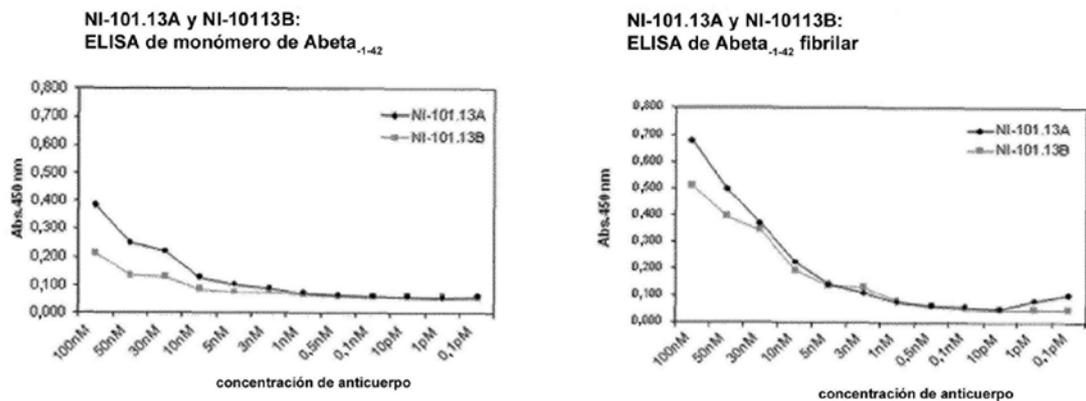


FIG. 13

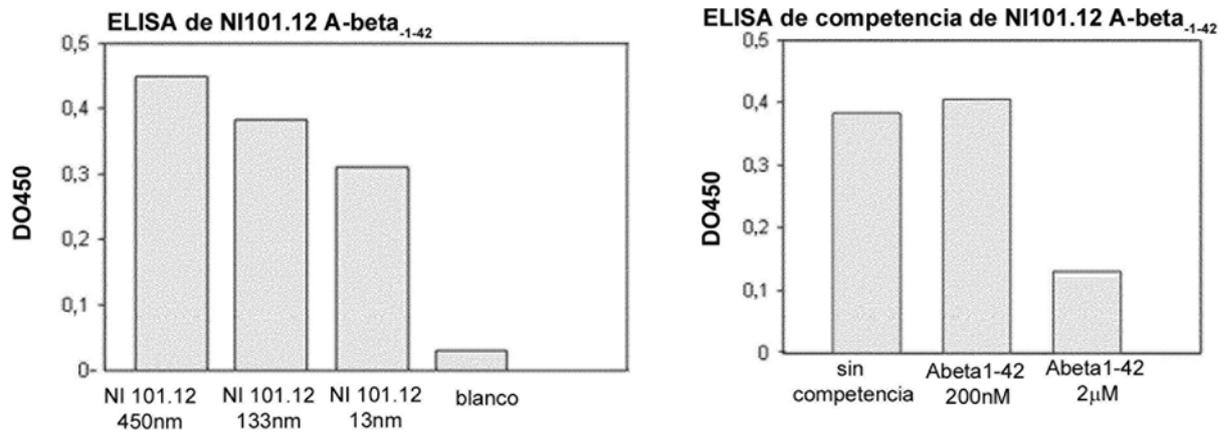


FIG. 14A-B

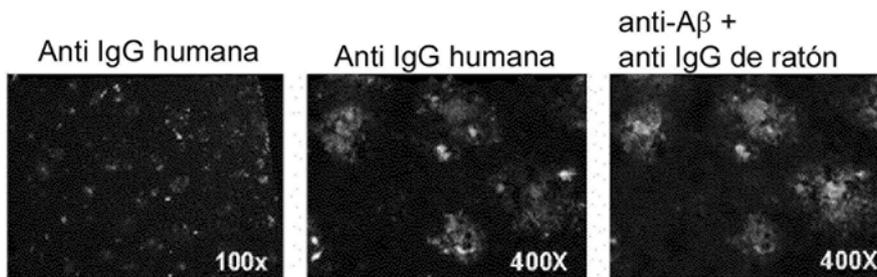


FIG. 15

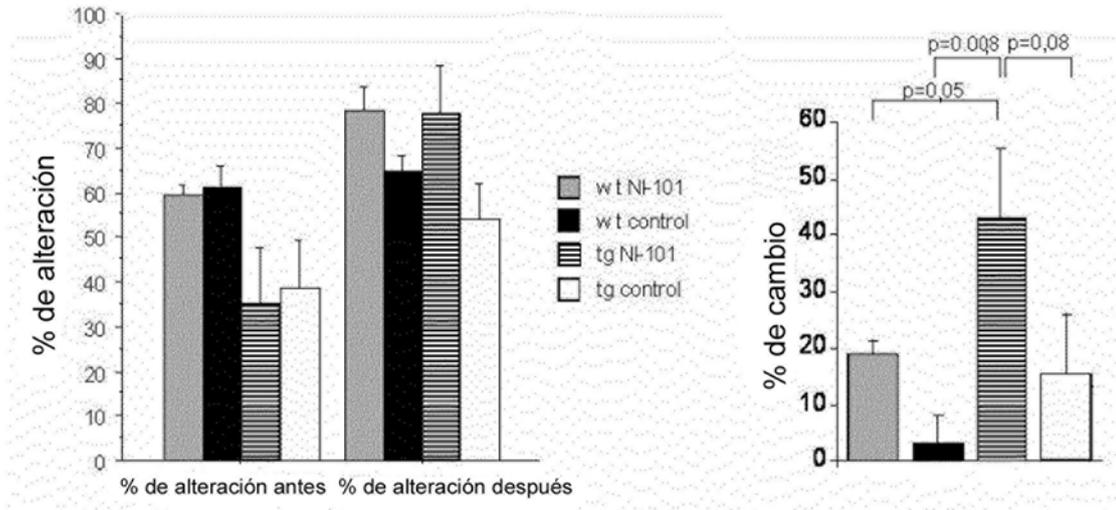


FIG. 16A-B

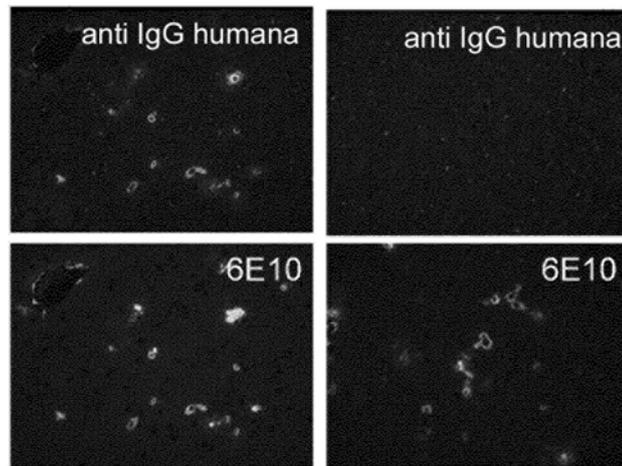


FIG. 17

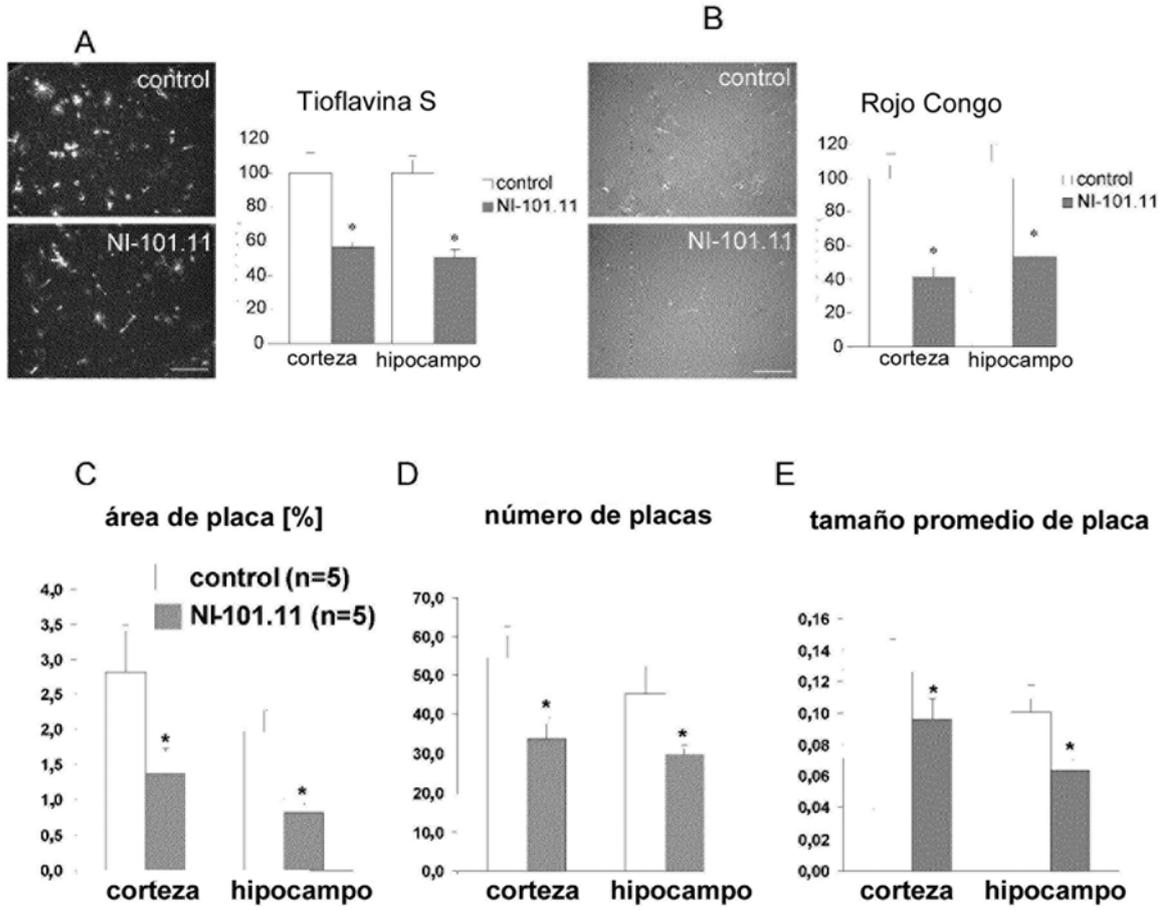


FIG. 18A-E

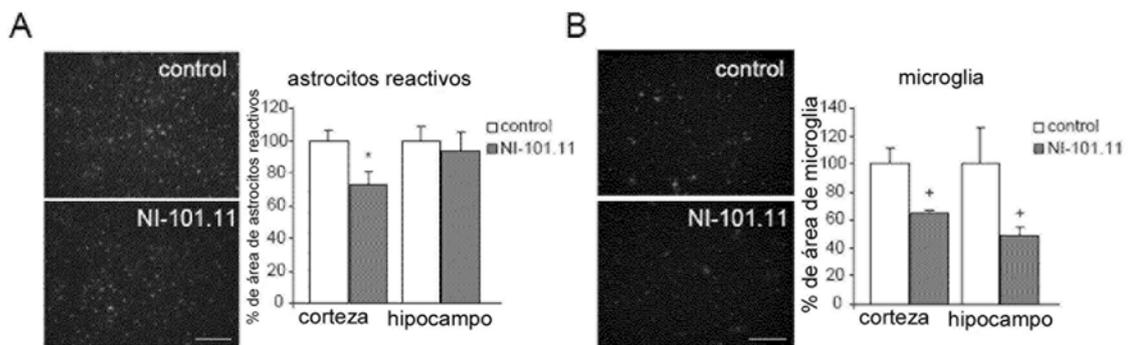


FIG. 19A-B

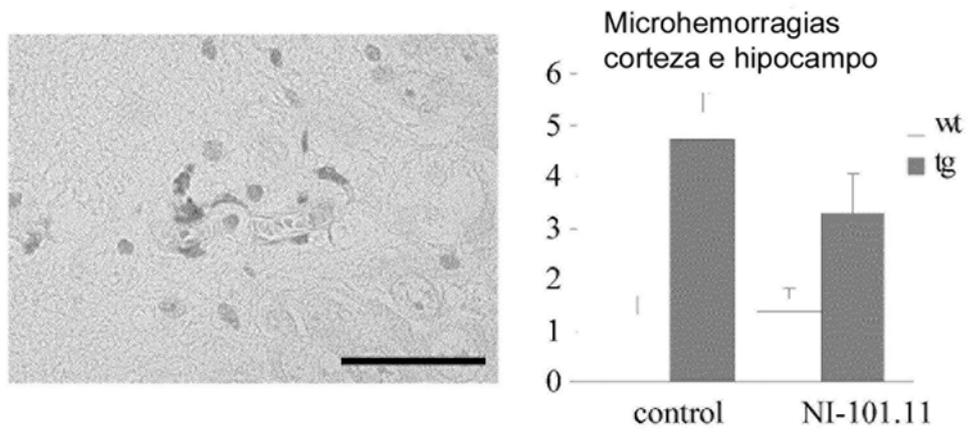


FIG. 20

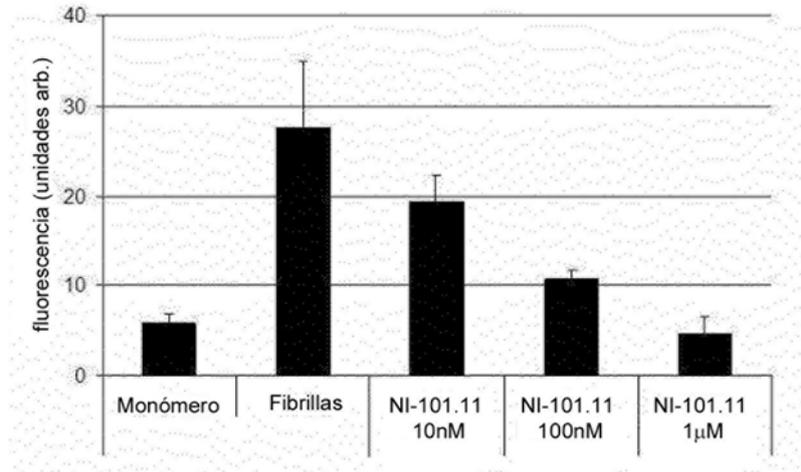


FIG. 21

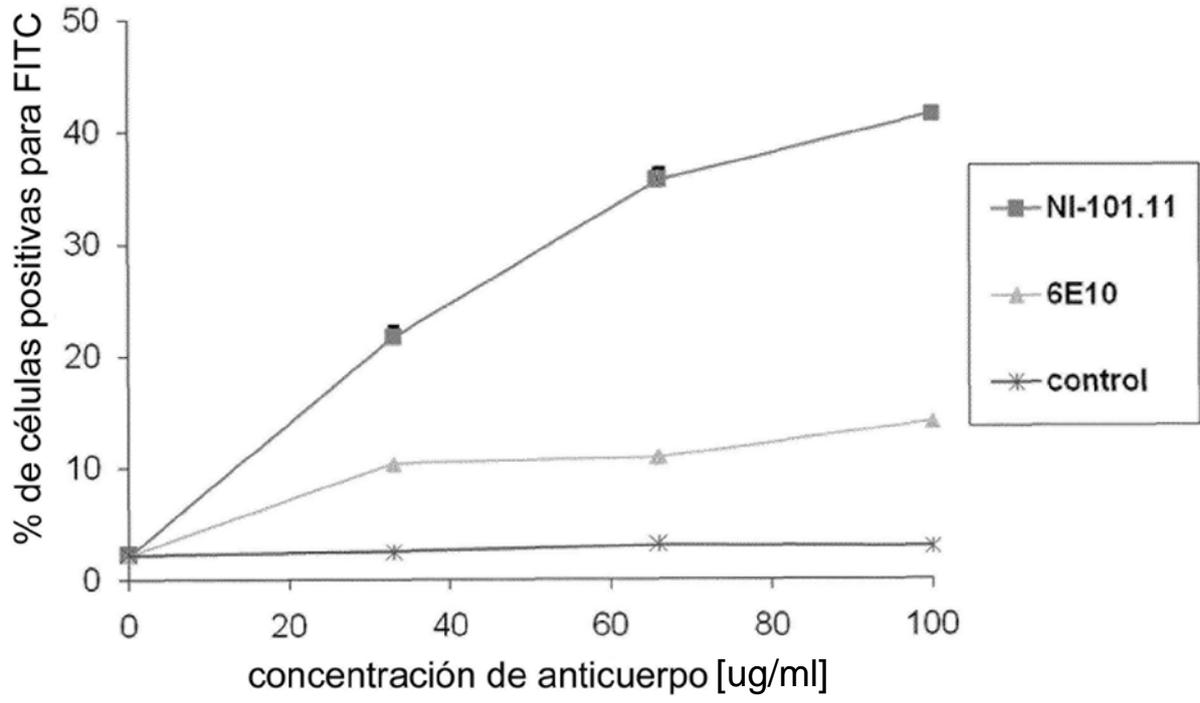


FIG. 22