

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 601**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2010 PCT/JP2010/063430**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011 WO11016567**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010 E 10806566 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2463368**

54 Título: **Anticuerpo humanizado antioligómero de amiloide-β**

30 Prioridad:

07.08.2009 US 232038 P

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

02.04.2018

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**KUBOTA, TSUGUO y
SUZUKI, NOBUYUKI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 661 601 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 humanizado antioligómero de amiloide- β

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un oligómero de proteína amiloide- β (en adelante denominado asimismo A β) y utilización del mismo.

10 Antecedentes de la técnica

Se considera basado en diversos elementos de prueba que el declive de la memoria en la enfermedad de Alzheimer (en adelante denominada EA) está causado por el resultado de una disfunción sináptica causada por oligómeros solubles de la proteína amiloide β (en adelante, la proteína amiloide β también se denomina A β , y el oligómero de proteína amiloide β también se denomina oligómero de A β) (documentos no de patente n° 1 y n° 2).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, existe la posibilidad de que una acumulación o depósito excesivo de oligómeros A β en el cerebro induce una serie de cascadas patológicas que pueden causar la EA. Lo anterior indica una posibilidad de que el tratamiento médico con diana en oligómeros A β puede resultar eficaz en el retraso o prevención de la aparición y la progresión de estadio patológico de la EA.

Sin embargo, los conocimientos relativos a la neurodegeneración causada por una molécula responsable de dicha hipótesis de cascada del amiloide como factor nuclear, en particular por oligómeros A β , ha sido demostrada principalmente en experimentos in vitro (documento no de patente n° 3) y no ha sido demostrada directamente in vivo.

Debido a que las estructuras específicas de los oligómeros A β no han sido estudiadas en los experimentos in vivo que han sido informadas anteriormente (documento no de patente n° 4), no se ha clarificado cuál es la toxicidad sináptica debida a los oligómeros A β endógenos.

Además, aunque se han llevado a cabo estudios en diversos ratones de modelo de EA, todavía no se ha identificado toxicidad para las neuronas de los oligómeros A β en el cerebro de un paciente de EA.

Además, todavía no se ha establecido por qué la formación de ovillos neurofibrilares (en adelante simplemente denominados ONF) y la pérdida de células nerviosas se produce antes de la patogénesis de las placas neuríticas en el córtex entorrinal humano y cómo los oligómeros A β se relacionan con dicha degeneración del tejido y disfunciones.

Como anticuerpos contra los oligómeros A β , se conocen los anticuerpos monoclonales de ratón antioligómero de A β (documento no de patente n° 4) NAB61, 1A9, 2C3, E12, 1C10 y 4D3 (documento de patente n° 1).

Es conocido que generalmente, en el caso de que se administre un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón, en el ser humano, dicho anticuerpo es reconocido como sustancia foránea de manera que se induce en el cuerpo humano un anticuerpo humano contra el anticuerpo de ratón (anticuerpo humano antiratón: HAMA). Es conocido que HAMA reacciona con el anticuerpo de ratón administrado, induciendo de esta manera efectos secundarios (documento no de patente n° 5), acelera la desaparición del anticuerpo de ratón del cuerpo (documentos no de patente n° 6, n° 9 y n° 10) y reduce el efecto terapéutico del anticuerpo de ratón (documentos no de patente n° 11 y n° 12).

Con el fin de resolver dichos problemas, se han realizado intentos para preparar un anticuerpo recombinante, tal como un anticuerpo quimérico humano y un anticuerpo humanizado a partir de un anticuerpo no humano utilizando técnicas de recombinación genética.

Los anticuerpos quiméricos humanos, los anticuerpos humanizados y similares presentan diversas ventajas en la aplicación clínica en el ser humano en comparación con los anticuerpos no humanos, tal como un anticuerpo de ratón. Por ejemplo, se ha informado de que su inmunogenicidad resulta reducida y su semivida en sangre resulta prolongada en un ensayo con monos, en comparación con un anticuerpo de ratón (documento no de patente n° 13).

Es decir, debido a que los anticuerpos quiméricos humanos, los anticuerpos humanizados y similares causan menos efectos secundarios en el ser humano que los anticuerpos no humanos, se espera que su efecto terapéutico se sostenga durante un tiempo prolongado.

Además, debido a que los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos quiméricos humanos, los anticuerpos humanizados y los anticuerpos humanos se preparan utilizando técnicas de recombinación, pueden prepararse como diversas formas de moléculas.

Por ejemplo, la subclase $\gamma 1$ puede utilizarse como una región constante (en adelante denominada "región C") de cadena pesada (en adelante denominada "cadena H") de un anticuerpo humano (la región C de cadena H se denomina "CH") para producir un anticuerpo recombinante con funciones efectoras elevadas, tal como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (en adelante denominada "actividad ADCC"). Además, la subclase $\gamma 2$ o $\gamma 4$ puede utilizarse como cadena pesada para producir un anticuerpo recombinante que presenta una función efectora reducida y que se espera que presente una semivida en sangre incrementada en comparación con los anticuerpos de ratón (documento no de patente nº 14).

En particular, debido a que las actividades citotóxicas tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (en adelante denominada "actividad CDC") y la actividad ADCC mediante la región Fc (la región después de la región bisagra de cadena pesada del anticuerpo) de un anticuerpo son importantes para la eficacia terapéutica, resulta preferido un anticuerpo quimérico humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano respecto a un anticuerpo animal no humano, tal como un anticuerpo de ratón (documentos no de patente nº 15 y nº 16).

Además, con los avances recientes en la ingeniería de proteínas y la ingeniería genética, también pueden prepararse anticuerpos recombinantes en forma de fragmento de anticuerpo con un peso molecular pequeño, tal como Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo de cadena sencilla (en adelante denominado "scFv") (documento no de patente nº 17), un fragmento de región V dimerizada (en adelante denominado "diacuerpo") (documento no de patente nº 18), un fragmento de región V estabilizada mediante disulfuro (en adelante denominado "dsFv") (documento no de patente nº 19) y un péptido que comprende un CDR (documento no de patente nº 20). Estos fragmentos de anticuerpo presentan una mayor ventaja en la transferencia a tejidos diana que las moléculas completas de anticuerpo (documento no de patente nº 21).

Lo expuesto anteriormente indica que un anticuerpo quimérico humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo de los mismos resulta más preferido como el anticuerpo que debe utilizarse para la aplicación clínica en el ser humano que los anticuerpos no humanos, tales como los anticuerpos de ratón.

30 Listado de referencias

Literatura de patentes

Literatura de patentes nº 1: Documento WO2009/051220

Literatura no de patentes

- Literatura no de patentes nº 1: Klein W.L., Trends Neurosci. 24:219-224, 2001.
 Literatura no de patentes nº 2: Selkoe D.J., Science 298:789-791, 2002.
 Literatura no de patentes nº 3: Hass C et al., Nature Review 8:101-12, 2007.
 Literatura no de patentes nº 4: Lee EB, et al., J.Biol.Chem.281:4292-4299, 2006.
 Literatura no de patentes nº 5: J.Clin.Oncol. 2:881, 1984,
 Literatura no de patentes nº 6: Blood 65:1349, 1985.
 Literatura no de patentes nº 7: J.Natl.Cancer Inst. 80:932, 1988.
 Literatura no de patentes nº 8: Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82:1242, 1985.
 Literatura no de patentes nº 9: J.Nucl.Med. 26:1011, 1985.
 Literatura no de patentes nº 10: J.Natl.Cancer Inst. 80:937, 1988.
 Literatura no de patentes nº 11: J.Immunol. 135:1530, 1985.
 Literatura no de patentes nº 12: Cancer Res. 46:6489, 1986.
 Literatura no de patentes nº 13: Cancer Res. 56:1118, 1996.
 Literatura no de patentes nº 14: Immunol. 85:668, 1995.
 Literatura no de patentes nº 15: J.Immunol. 144:1382, 1990.
 Literatura no de patentes nº 16: Nature 322:323, 1988.
 Literatura no de patentes nº 17: Science 242:423, 1988.
 Literatura no de patentes nº 18: Nature Biotechnol. 15:629, 1997.
 Literatura no de patentes nº 19: Molecular Immunol. 32:249, 1995.
 Literatura no de patentes nº 20: J.Biol.Chem. 271:2966, 1996.
 Literatura no de patentes nº 21: Cancer Res. 52:3402, 1992.

60 Sumario de la invención

Problema técnico

El documento no de patente nº 4 y el documento de patente nº 1 anteriormente indicados dan a conocer anticuerpos contra los oligómeros A β . Sin embargo, dichos anticuerpos se unen no sólo a un oligómero de A β

sino también a un monómero A β . Por lo tanto, existe preocupación sobre los efectos secundarios centrales del anticuerpo durante la terapia de anticuerpos para la EA, que presenta como diana la patología en el cerebro.

5 Por este motivo, el propósito de la presente invención es proporcionar un anticuerpo humanizado que no se une a un monómero A β y se une específicamente únicamente a un oligómero de A β y la utilización del mismo. Más específicamente, el propósito es proporcionar un anticuerpo que se une específicamente a un oligómero de A β , un método para medir un oligómero de A β utilizando el anticuerpo, un método para diagnosticar la EA utilizando el anticuerpo y un medicamento que comprende el anticuerpo.

10 Solución al problema

15 Como resultado de la intensa deliberación en vista del problema anteriormente expuesto, los presentes inventores han encontrado un anticuerpo humanizado que no se une a un monómero A β y que se une específicamente sólo a un oligómero de A β y han llevado a cabo la presente invención. Es decir, la presente invención se refiere a lo siguiente.

- 20 1. Un anticuerpo humanizado que no se une a un oligómero proteico amiloide β y se une a un oligómero de amiloide β , en el que la región variable de cadena pesada de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 12 y la región variable de cadena ligera de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 14.
2. El anticuerpo humanizado según el ítem 1, anteriormente, para la utilización en la prevención o tratamiento de la disfunción cognitiva o de la enfermedad de Alzheimer.
3. El anticuerpo humanizado según el ítem 1, anteriormente, para la utilización en la supresión de la formación de la placa neurítica o en la inhibición de la formación de fibras de amiloide A β .
- 25 4. El anticuerpo humanizado según el ítem 1, anteriormente, en la supresión del avance de la enfermedad de Alzheimer.
5. Utilización del anticuerpo humanizado según el ítem 1, anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la prevención o tratamiento de la disfunción cognitiva.
6. Utilización del anticuerpo humanizado según el ítem 1, anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 30 7. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado según el ítem 1, anteriormente, mezclada con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

35 Efectos ventajosos de la invención

El anticuerpo de la presente invención se espera que establezca métodos para la prevención y el tratamiento de la EA y un marcador diagnóstico en un estadio temprano que reconoce una proteína A β que es una molécula causativa de la EA.

40 Existe interés en la transferencia intracerebral del anticuerpo durante la terapia con anticuerpos para la EA con diana en la patología del cerebro. Sin embargo, existe la posibilidad de que el anticuerpo de la presente invención resulte aplicable a la terapia clínica mediante la administración en una vena periférica y podría considerarse que el desarrollo en el tratamiento de anticuerpos de la EA debe acelerarse inmediatamente.

45 Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 representa una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada HV0 y residuos aminoácidos modificados respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 12 en HV2, HV3, HV4, HV5, HV7a, HV7b, HV9 y HV12. La primera y segunda líneas en el dibujo indican los números de aminoácidos en la región variable de cadena H y las letras en las otras líneas respectivas indican el aminoácido sustituido (representado por un código de una sola letra).

[Figura 2] La figura 2 representa una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena L LV0 y los residuos aminoácidos modificados respecto a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 14 en LV2a, LV2b, LV2c, LV2d, LV3 y LV4. La primera y segunda filas en el dibujo indican los números de aminoácidos en la región variable de cadena L y las letras en las filas respectivas indican el aminoácido alterado (representado por una sola letra).

[Figura 3] La figura 3 representa unos sensogramas obtenidos mediante la medición de las actividades de unión de cada anticuerpo humanizado antioligómero de A β contra monómeros A β utilizando un sistema Biacore.

Descripción de las formas de realización

65 El anticuerpo humanizado antioligómero de A β de la presente invención (en lo sucesivo, también denominado anticuerpo de la presente invención o anticuerpo humanizado de la presente invención) es un anticuerpo

humanizado caracterizado porque se une a un oligómero de A β y no se une a un monómero A β . El anticuerpo de la presente invención preferentemente es un anticuerpo aislado, un anticuerpo purificado o una composición de anticuerpos.

5 El anticuerpo aislado, el anticuerpo purificado y la composición de anticuerpos son los anticuerpos que comprenden sustancialmente 100% del anticuerpo deseado y no contienen ninguna impureza, tal como proteínas contaminantes en la producción del anticuerpo, derivado de las células productoras de anticuerpos, tejidos, animales productores de anticuerpos y similares.

10 El anticuerpo es una proteína heterotetramérica constituida por dos cadenas pesadas (cadenas H) y dos cadenas ligeras (cadenas L). El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que reconoce un único antígeno.

El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo secretado por un único clon de células productoras de anticuerpos y reconoce únicamente un epítipo (también denominado determinante antigénico) y presenta una secuencia de aminoácidos (estructura primaria) uniforme.

15 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. En el anticuerpo monoclonal de la presente invención, las regiones determinantes de complementariedad (en adelante denominadas CDR) 1 a 3 de la cadena pesada de anticuerpo (en adelante denominada cadena H) comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por la SEC ID n° 1 a 3, respectivamente y las CDR 1 a 3 en la cadena L comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID n° 4 a n° 6, respectivamente. Estas son las secuencias de CDR de un anticuerpo monoclonal en el que la región variable de cadena pesada (en adelante denominada VH) del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 8 y la región variable de cadena L (en adelante denominada VL) comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 10 y del anticuerpo monoclonal de ratón antioligómero de A β 6E4.

20 Como epítipo, una única secuencia de aminoácidos que es reconocida y se une al anticuerpo monoclonal, se proporcionan a título ejemplar una conformación que comprende la secuencia de aminoácidos anteriormente indicada, la secuencia de aminoácidos anteriormente indicada a la que se une una cadena sacárida y una conformación que comprende las secuencias de aminoácidos anteriormente indicadas a las que se unen cadenas sacáridas.

30 El epítipo que debe ser reconocido por el anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier proteína con la condición de que incluya por lo menos una de entre una proteína A β y un fragmento de la misma, y existe sobre un oligómero de A β que forma un complejo.

Entre los ejemplos del epítipo al que se une el anticuerpo de la presente invención se incluye un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos primaria de A β que se encuentra expuesto sobre un oligómero de A β , un epítipo que comprende una conformación de un oligómero de A β y similares.

40 Es conocido que la proteína A β como componente principal del amiloide es un péptido que comprende 40 a 42 aminoácidos y es producido a partir de una proteína precursora denominada proteína precursora del amiloide (en adelante denominada PPA) mediante la acción de una proteasa.

45 Entre las moléculas de amiloide producidas a partir de la PPA se incluye un polímero no fibrilar de monómeros solubles y oligómeros solubles además de la fibra amiloide recolectada en una fracción de sedimento de ultracentrífuga.

50 En la presente invención, el oligómero de A β es un polímero no fibrilar y es un oligómero de A β que comprende por lo menos una de entre una proteína A β y un fragmento de la misma y forma un complejo.

Específicamente, entre los ejemplos de un oligómero de A β se incluyen un oligómero de A β 40(A β 1-40), un oligómero de A β 42(A β 1-42) y un oligómero de A β que comprende por lo menos uno de entre A β 40 y A β 42.

55 Además, entre los ejemplos del oligómero de A β en la presente invención se incluyen además un oligómero de A β que comprende un fragmento de A β con la pérdida del extremo N-terminal de A β en por lo menos uno de entre A β 40 y A β 42.

60 Específicamente, el oligómero de A β 42 en la presente invención son moléculas con un peso molecular de 45 a 160 kDa medido mediante SDS-PAGE y un peso molecular de entre 22,5 y 1.035 kDa medido mediante Blue Native-PAGE.

65 El oligómero de A β 42 se recupera principalmente en el líquido de retención >100 kDa del tamiz molecular. Además, el oligómero de A β muestra una mezcla de configuraciones que consiste en moléculas en forma de partículas, moléculas en forma de perla y moléculas circulares con alturas de entre 1,5 y 3,1 nm en un microscopio de fuerza atómica.

Además, el oligómero de A β 42 anteriormente indicado se eluye a una fracción de volumen en vacío 8 de peso molecular de 680 kDa o superior y a una fracción 15 de peso molecular 17 a 44 kDa de límite mediante el método de filtración en gel.

5

El anticuerpo de la presente invención puede utilizarse con la condición de que sea un anticuerpo humanizado que se una a un oligómero de A β y no se una a un monómero A β , y la derivación y forma del mismo no se encuentran limitados.

10

El anticuerpo de la presente invención no reconoce un monómero amiloide β (A β) soluble que es una molécula fisiológica y reacciona únicamente con un oligómero de A β soluble.

15

En la presente invención, la unión a únicamente un oligómero de A β soluble sin unión a un monómero A β soluble se refiere a que, entre los monómeros A β y oligómeros A β separados mediante ultrafiltración y tamiz molecular, el anticuerpo no reconoce monómeros (de aproximadamente 4,5 kDa) pero reconoce específicamente un oligómero de A β soluble que es igual o de mayor tamaño que los dímeros A β . De acuerdo con lo anteriormente expuesto, resulta preferido que el anticuerpo de la presente invención se una específicamente a un oligómero de A β soluble que es igual o de mayor tamaño que un dímero A β .

20

El anticuerpo de la presente invención presenta preferentemente por lo menos una actividad de entre (1) a (5) a continuación:

25

- (1) actividad antineurotoxicidad,
- (2) actividad supresora de la formación de fibras amiloides A β ,
- (3) especificidad para el reconocimiento de únicamente un oligómero de A β ,
- (4) capacidad de captura de un oligómero de A β en cerebros con EA,
- (5) capacidad de prevención de patogénesis de tipo EA (declive de la memoria, acumulación de A β en el cerebro) en un ratón transgénico para APP^{swe} (Tg2576).

30

Las actividades del anticuerpo de la presente invención referidas a (1) a (5), anteriormente, pueden confirmarse utilizando el método dado a conocer en el documento n° WO 2009/051220.

35

El anticuerpo de la presente invención puede prepararse como anticuerpo recombinante. En la presente invención, el anticuerpo recombinante incluye un anticuerpo producido mediante tecnología de recombinación y es un anticuerpo humanizado (un anticuerpo con injerto de CDR humana).

40

Resulta preferido como agente terapéutico un anticuerpo recombinante con carácter de anticuerpo monoclonal, baja inmunogenicidad y semivida prolongada en sangre. Entre los ejemplos del anticuerpo recombinante se incluye un anticuerpo obtenido mediante modificación del anticuerpo monoclonal de la presente invención utilizando tecnología de recombinación.

45

El anticuerpo humanizado de la presente invención es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de CDR de VH y VL de un anticuerpo obtenido de un animal no humano se injertan en posiciones apropiadas de VH y VL de un anticuerpo humano.

50

El anticuerpo humanizado puede producirse mediante el diseño de una secuencia de aminoácidos de las regiones V en la que las secuencias de aminoácidos de CDR de tanto VH como VL del anticuerpo monoclonal que es producido por un hibridoma animal no humano y se une específicamente a un oligómero de A β , se injertan en las regiones marco (en adelante denominadas "FR") de VH y VL de cualquier anticuerpo humano, respectivamente, mediante la construcción de ADNc codificantes de las regiones V, la inserción de cada una de ellas en un vector de expresión para células animales que comprenden genes codificantes de CH y CL de un anticuerpo humano, la construcción de esta manera un vector para la expresión de anticuerpo humanizado y la introducción del mismo en una célula animal para expresar y producir de esta manera el anticuerpo humanizado.

55

Como secuencias de aminoácidos de las FR de VH y VL de un anticuerpo humanizado, pueden utilizarse cualesquiera secuencias de aminoácidos, con la condición de que sean secuencias de aminoácidos de VH y VL, respectivamente, obtenidas de un anticuerpo humano.

60

Entre los ejemplos se incluyen secuencias de aminoácidos de FR de VH y VL de anticuerpos humanos registrados en una base de datos tal como la Protein Data Bank, secuencias de aminoácidos comunes de cada subgrupo de FR de VH y VL de anticuerpos humanos indicados en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991) y similares.

65

El anticuerpo humanizado de la presente invención es un anticuerpo humanizado en el que las CDR 1 a 3 de la VH del anticuerpo comprenden secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID n° 1 a n° 3,

respectivamente, y las CDR 1 a 3 de la VL del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID nº 4 a nº 6, respectivamente.

5 El anticuerpo humanizado de la presente invención es un anticuerpo humanizado que comprende (a) VH y (b) VL a continuación:

- (a) VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 12,
- (b) VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 14.

10 Entre los ejemplos de VH contenido en otros anticuerpos humanizados se incluyen, por ejemplo, VH que comprende una secuencia de aminoácidos en la que Lys en la posición 12, Val en la posición 20, Arg en la posición 38, Gln en la posición 39, Leu en la posición 45, Met en la posición 48, Arg en la posición 67, Val en la posición 68, Ile en la posición 70, Ala en la posición 72, Thr en la posición 74 y Ala en la posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 12 son sustituidos por otros residuos aminoácidos.

15 Entre los ejemplos de otros anticuerpos humanizados se incluyen VL que comprende una secuencia de aminoácidos en la que Ile en la posición 2, Pro en la posición 15, Gln en la posición 50, Tyr en la posición 92 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 14 son sustituidos por otros residuos aminoácidos y entre los ejemplos preferentes de VL de la presente invención se incluyen además VL que comprende una secuencia de aminoácidos en la que Pro en la posición 15, Gln en la posición 50 y Tyr en la posición 92 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 14 son sustituidos por otros residuos aminoácidos.

20 Entre las secuencias de aminoácidos de la VH mostrada en la figura 1, 6E4HV0 es la VH del anticuerpo de la invención. Además, entre las secuencias de aminoácidos de la VL mostrada en la figura 2, 6E4LV0 es la VL del anticuerpo de la invención.

25 Específicamente, el anticuerpo humanizado de la invención comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 12 y la VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 14.

30 Como combinación de la secuencia de aminoácidos de la VH mostrada en la figura 1 y la secuencia de aminoácidos de la VL mostrada en la figura 2, la combinación de HV0 y LV0 es el anticuerpo de la invención. Entre otras combinaciones se incluyen HV0 y LV2a, HV0 y LV4 y HV12 y LV4.

35 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el anticuerpo de la presente invención es el anticuerpo humanizado (1) siguiente:

- (1) un anticuerpo humanizado (HV0LV0) que comprende VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada como HV0 en la figura 1 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada como LV0 en la figura 2.

Entre otros anticuerpos humanizados se incluyen:

- 45 (2) un anticuerpo humanizado (HV0LV2a) que comprende VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada como HV0 en la figura 1 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada como LV2a en la figura 2,
- (3) un anticuerpo humanizado (HV0LV4) que comprende VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada como HV0 en la figura 1 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada como LV4 en la figura 2,
- 50 (4) un anticuerpo humanizado (HV12LV4) que comprende VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada como HV12 en la figura 1 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada como LV4 en la figura 2.

55 Entre los ejemplos específicos de los anticuerpos anteriormente indicados se incluyen un anticuerpo humanizado en el que la combinación de las secuencias de aminoácidos contenidas en VH y VL son las SEC ID nº 12 y nº 14 (el anticuerpo de la invención), las SEC ID nº 12 y nº 16, las SEC ID nº 12 y nº 17 y las SEC ID nº 15 y nº 17.

60 Además, se da a conocer un anticuerpo humanizado que compite con el anticuerpo humanizado anteriormente indicado para la unión a un oligómero de A β y un anticuerpo humanizado que se une a un epítipo que es el mismo que el epítipo reconocido por el anticuerpo humanizado anteriormente indicado.

65 Un anticuerpo humano es originalmente un anticuerpo existente de manera natural en el cuerpo humano e incluye además anticuerpos obtenidos de una biblioteca fágica de anticuerpos humanos, un animal transgénico productor de anticuerpos humanos y similares, los cuales son preparados basándose en los recientes avances en las técnicas de ingeniería genética, ingeniería celular e ingeniería del desarrollo.

El anticuerpo existente en el cuerpo humano puede prepararse, por ejemplo, mediante el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana, inmortalizándolos mediante la infección con virus EB o similar y clonándolos después para obtener de esta manera linfocitos capaces de producir el anticuerpo; cultivar los linfocitos obtenidos de esta manera y purificar el anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo.

5 La biblioteca fágica de anticuerpos humanos es una biblioteca en la que se expresan fragmentos de anticuerpos, tales como Fab y scFv, sobre la superficie fágica mediante la inserción de un gen codificante de un anticuerpo preparado a partir de una célula B humana en un gen fágico.

10 Puede recuperarse a partir de la biblioteca un fago que expresa un fragmento de anticuerpo con la actividad de unión a antígeno deseada sobre la superficie celular, utilizando su actividad para unirse a un sustrato inmovilizado de antígeno como el índice. El fragmento de anticuerpo puede convertirse además en una molécula de anticuerpo humano que comprende dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

15 Un animal transgénico productor de anticuerpos humanos es un animal en el que se encuentra integrado un gen de anticuerpo humano en las células. Específicamente, puede prepararse un animal transgénico producto de anticuerpo humano mediante la introducción de un gen codificante de un anticuerpo humano en una célula ES de ratón, injertando la célula ES en un embrión de estadio temprano de otro ratón y permitiendo que se desarrolle seguidamente hasta formar un animal completo.

20 Puede prepararse un anticuerpo humano obtenido del animal no humano transgénico producto de anticuerpo humano mediante la obtención de un hibridoma producto de anticuerpo humano mediante un método de preparación de hibridomas habitualmente llevado a cabo en animales no humanos, el cultivo del hibridoma obtenido y la producción y acumulación del anticuerpo humano en el sobrenadante del cultivo.

25 Se da a conocer además un anticuerpo o fragmento del mismo en el que uno o más aminoácidos han sido eliminados, sustituidos, insertados o añadidos en la secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo o fragmento de anticuerpo anteriormente indicado, con una actividad similar a la del anticuerpo o fragmento de anticuerpo anteriormente indicado.

30 El número de residuos aminoácidos que son eliminados, sustituidos, insertados y/o añadidos es uno o más, y no se encuentra específicamente limitado, aunque se encuentra comprendido dentro del intervalo en el que resulta posible la eliminación, sustitución o adición mediante los métodos conocidos, tales como la mutagénesis dirigida a sitio descrita en Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997; Nucleic Acids Research 10:6487, 1982; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409, 1982; Gene 34:315, 1985; Nucleic Acids Research 13:4431, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985, o similares. Por ejemplo, el número es de 1 a varias docenas, preferentemente de 1 a 20, más preferentemente de 1 a 10 y todavía más preferentemente de 1 a 5.

35 La eliminación, sustitución, inserción o adición de uno o más residuos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anteriormente indicado significa lo siguiente. Es decir, se refiere a que existe una eliminación, sustitución, inserción o adición de uno o una pluralidad de residuos aminoácidos en cualesquiera posiciones en una o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del anticuerpo dentro de una única secuencia. Además, la eliminación, sustitución, inserción o adición pueden producirse simultáneamente y el aminoácido que se sustituye, inserta o añade puede ser de tipo natural o de tipo no natural.

40 Entre los aminoácidos de tipo natural se incluyen L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isooleucina, L-leucina, L-lisina, L-arginina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, L-cisteína y similares.

Los ejemplos preferidos de aminoácidos mutuamente sustituibles se muestran a continuación, Los aminoácidos en el mismo grupo son mutuamente sustituibles.

- 55 Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, O-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina y ciclohexilalanina.
 Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadipico y ácido 2-aminosubérico.
 Grupo C: asparagina y glutamina.
 60 Grupo D: lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico y ácido 2,3-diaminopropiónico.
 Grupo E: prolina, 3-hidroxi prolina y 4-hidroxi prolina.
 Grupo F: serina, treonina y homoserina.
 Grupo G: fenilalanina y tirosina.

65 Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', scFv, diacuerpo, dsFv, un péptido que comprende CDR y similares.

5 Un Fab es un fragmento de anticuerpo que presenta un peso molecular de aproximadamente 50.000 y con actividad de unión a antígenos, en el que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L entera, de entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de una molécula de anticuerpo IgG con una proteína, la papaína (cortada en un residuo aminoácido en la posición 224 de la cadena H), se unen entre sí mediante un enlace disulfuro.

10 El Fab puede obtenerse mediante el tratamiento de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un oligómero de A β y se une al dominio extracelular, con una proteasa, la papaína. Además, el Fab puede producirse mediante la inserción de ADN codificante de Fab del anticuerpo en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotes, y la introducción del vector en un procarionte o eucariote para expresar el Fab.

15 Un F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que presenta un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión a antígenos y que comprende dos regiones Fab que se encuentran unidas en la parte de bisagra obtenida mediante la digestión de la parte inferior de dos enlaces disulfuro en la región bisagra de IgG con un enzima, la pepsina.

20 El F(ab')₂ puede obtenerse mediante el tratamiento de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un oligómero de A β y se une al dominio extracelular, con una proteasa, la pepsina. Además, el F(ab')₂ puede producirse mediante la unión de Fab' indicado posteriormente, mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

25 Un Fab' es un fragmento de anticuerpo que presenta un peso molecular de aproximadamente 50.00 y actividad de unión a antígenos, que se obtiene mediante el corte de un enlace disulfuro en la región bisagra de F(ab')₂ anteriormente descrito.

El Fab' puede obtenerse mediante el tratamiento de F(ab')₂ que reconoce específicamente un oligómero de A β y se une al dominio extracelular, con un agente reductor, el ditioneitol.

30 Además, el Fab' puede producirse mediante la inserción de ADN codificante del fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotes, y la introducción del vector en un procarionte o eucariote para expresar el Fab'.

35 Un scFv es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH en el que se unen una cadena VH y una cadena VL utilizando un péptido conector apropiado (en adelante denominado "P") y es un fragmento de anticuerpo que presenta actividad de unión a antígenos.

40 El scFv puede producirse mediante la obtención de los ADNc codificantes de VH y VL de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un oligómero de A β y que se une al dominio extracelular, la construcción de ADN codificante del scFv, la inserción del ADN en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotes y seguidamente la introducción del vector de expresión en un procarionte o eucariote para expresar el scFv.

45 Un diacuerpo es un fragmento de anticuerpo en el que se ha dimerizado el fragmento scFv y que presenta actividad divalente de unión a antígeno. En la actividad divalente de unión a antígeno, los dos antígenos pueden ser iguales o diferentes.

50 El diacuerpo puede producirse mediante la obtención de los ADNc codificantes de VH y VL de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un oligómero de A β y se une al dominio extracelular, la construcción de ADN codificante del scFv de manera que la longitud de la secuencia de aminoácidos de P sea de 8 o menos residuos, la inserción del ADN en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotes, y seguidamente la introducción del vector de expresión en un procarionte o eucariote para expresar el diacuerpo.

55 Se obtiene un dsFv mediante la unión de polipéptidos en los que se sustituye un residuo aminoácido de cada uno de VH y VL por un residuo de cisteína mediante un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína. El residuo aminoácido que debe sustituirse con un residuo de cisteína puede seleccionarse basándose en una estimación de la estructura tridimensional del anticuerpo de acuerdo con el método mostrado en Reiter et al. [Protein Engineering 7:697, 1994].

60 El dsFv puede producirse mediante la obtención de los ADNc codificantes de VH y VL de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un oligómero de A β y se une al dominio extracelular, la construcción de ADN codificante de dsFv, la inserción del ADN en un vector de expresión para procariontes o en un vector de expresión para eucariotes, e introduciendo seguidamente el vector de expresión en un procarionte o eucariote para expresar el dsFv.

65

Un péptido que comprende CDR se constituye mediante la inclusión de por lo menos una o más regiones CDR de VH o VL. Puede producirse un péptido que comprende una pluralidad de CDR mediante la conexión de las CDR directamente o mediante un péptido conector apropiado.

5 El péptido que comprende CDR puede producirse mediante la construcción de ADN codificante de las CDR de VH y VL de un anticuerpo humanizado que reconoce específicamente un oligómero de A β de la presente invención, la inserción del ADN en un vector de expresión para procariontes o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo seguidamente el vector de expresión en un procarionte o eucariota para la expresión del péptido. El péptido que comprende CDR también puede producirse mediante un método de síntesis química, tal como un método de Fmoc o un método de tBoc.

10 El anticuerpo de la presente invención puede ser un derivado de anticuerpo en el que el anticuerpo humanizado antioligómero de A β de la presente invención o el fragmento del mismo se une química o genéticamente a un isótopo radioactivo, a un agente bajo peso molecular, a un agente de alto peso molecular, a una proteína, a un anticuerpo terapéutico y similares.

15 El derivado de anticuerpo puede producirse conjugando químicamente un isótopo radioactivo, un agente de bajo peso molecular, un agente de alto peso molecular, una proteína, un anticuerpo terapéutico y similares con el lado N-terminal o con el lado C-terminal de una cadena H o L del anticuerpo humanizado antioligómero de A β o fragmento del mismo, un sustituyente o cadena lateral apropiado del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, una cadena sacárida en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y similares [Antibody Engineering Handbook, publicado por Chijin Shokan, 1994].

20 Además, el derivado de anticuerpo puede producirse genéticamente mediante la unión de un ADN codificante del anticuerpo humanizado antioligómero de A β de la presente invención o fragmento del mismo a otro ADN codificante de una proteína que debe conjugarse o a un ADN codificante de un anticuerpo terapéutico, la inserción del ADN en un vector para la expresión y la introducción del vector de expresión en una célula hospedadora.

25 En el caso en que el derivado de anticuerpo anteriormente indicado se utilice como reactivo de detección, reactivo para la determinación cuantitativa o agente diagnóstico para un método de detección, de cuantificación o de diagnóstico, respectivamente, entre los ejemplos del agente con el que se conjuga el anticuerpo humanizado antioligómero de A β o fragmento del mismo, se incluye un marcaje que se utiliza generalmente en la detección inmunológica o método de medición.

30 El marcaje incluye enzimas, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa y la luciferasa, materiales luminiscentes, tales como éster de acridinio y lofina, materiales fluorescentes, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de tetrametil-rodamina (RITC).

35 A continuación en la presente memoria se describe un método para producir el anticuerpo.

1. Producción de anticuerpo monoclonal antioligómero de A β

40 Puede producirse un anticuerpo monoclonal antioligómero de A β de la manera siguiente.

45 (1) Preparación de antígeno

Como método para producir un oligómero de A β como antígeno, se disuelve un A β 1-42 sintético (Peptide Institute, Inc., Osaka) en agua destilada desionizada o en tampón fosfato 10 mmoles/l y se incuba a 37°C durante 18 horas y el péptido se separa mediante SDS-PAGE al 4-12% y el material resultante se visualiza mediante tinción de CBB. A continuación, únicamente se recolecta un tetrámero de A β 1-42 sin contaminación de monómeros de A β 1-42 y de esta manera pueden producirse oligómeros de A β 1-42.

50 Pueden prepararse oligómeros de A β 1-42 que comprenden un mayor número de oligómeros mediante la conjugación química de 6-carboxitetrametilrodamina (6-TAMRA) (SIGMA) con el extremo N-terminal del péptido A β 1-40 sintetizado, utilizando un método convencional, seguido de la reacción de polimerización con el A β 1-40 sintético (Peptide Institute, Inc., Osaka).

55 (2) Inmunización de los animales

60 En primer lugar, se emulsionan 2,5 μ g de tetrámeros de A β 1-42 u oligómeros de A β 1-40 con adyuvante completo de Freund. A continuación, se inmunizan ratones Balb-c en la almohadilla plantar con el antígeno. Después se llevaron a cabo seis inmunizaciones adicionales. La fusión entre las células productoras del anticuerpo y las células de mieloma pueden llevarse a cabo mediante un método conocido, tal como el método de Kohler y Milstein (Kohler G. y Milstein C., Methods Enzymol. 73:3-46, 1981) o similares. Específicamente, los inmunocitos

65

productores del anticuerpo se obtienen de ganglios linfáticos inguinales de los ratones inmunizados con el antígeno.

5 La inmunización se lleva a cabo mediante la administración del antígeno en el animal mediante inyección subcutánea, intravenosa o intraperitoneal junto con un adyuvante apropiado, tal como adyuvante completo de Freund y la combinación de gel de hidróxido de aluminio con vacuna pertussis.

10 En el caso de que se utilice un péptido parcial como el antígeno, se produce un conjugado con una proteína portadora, tal como BSA (albúmina de suero bovino) y KLH (hemocianina de lapa americana) para la utilización como el antígeno.

15 El animal inmunizado con un antígeno puede ser cualquier animal con la condición de que puede prepararse un hibridoma, y preferentemente se utilizan ratones, ratas, hámsters, pollos, conejos o similares. Además, el anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo producido por un hibridoma obtenido mediante la fusión de una célula de mieloma con la célula que presenta actividad productora de anticuerpos que se ha obtenido de dicho animal tras la inmunización in vitro.

(3) Preparación de células de mieloma

20 Las líneas celulares establecidas obtenidas de ratones se utilizan como células de mieloma. Entre los ejemplos se incluyen la línea celular de mieloma murino resistente a 8-azaguanina (obtenida de BALB/c) P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology 18:1, 1978], P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [European J. Immunology 6:511, 1976], SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature 276:269, 1978], P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology 123:1548, 1979], P3-X63-Ag8 (X63) [Nature 256:495, 1975] y similares.

25 Las células de mieloma se subcultivan en un medio normal [medio RPMI1640 que contiene glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, FBS y 8-azaguanina]. Las células se transfirieron al medio normal 3 o 4 días antes de la fusión celular para garantizar un número de células de 2×10^7 o superior el día de la fusión.

30 (4) Fusión celular y preparación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales

Un hibridoma puede producirse mediante la fusión de las células productoras de anticuerpos para la utilización obtenidas en la etapa (2) y las células de mieloma obtenidas en la etapa (3) utilizando polietilenglicol 1500.

35 Tras el cultivo, se muestrea una parte del sobrenadante de cultivo y se somete a un método de cribado de hibridomas, tal como la transferencia de puntos y ensayo de unión para identificar la población celular productora de anticuerpos que son reactivos con oligómeros de A β y no con monómeros de A β , tal como se indica posteriormente. A continuación, se lleva a cabo la clonación dos veces mediante un método de dilución limitante [medio HT (medio HAT sin aminopterina) en la primera ronda y el medio normal se utiliza en la segunda ronda] y se selecciona un hibridoma que muestra establemente un título elevado de anticuerpos como hibridoma productor de anticuerpos monoclonales.

40 (5) Preparación de anticuerpos monoclonales purificados

45 Las células de hibridoma productoras de un anticuerpo monoclonal obtenido mediante la etapa (4) se administran mediante inyección intraperitoneal en ratones de 8 a 10 semanas de edad o ratones desnudos que son pretratados con pristano (se administran por vía intraperitoneal 0,5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano), seguido de la alimentación durante 2 semanas).

50 El hibridoma forma tumor de ascites en 10 a 21 días. El líquido ascítico es recolectado de los ratones, centrifugado para separar los sólidos, sometido a precipitación salina con sulfato amónico al 40-50% y después precipitado con ácido caprílico; se pasa por una columna de DEAE-sefaraosa, por una columna de proteína A o una columna de filtración en gel para recolectar fracciones de IgG o IgM en forma de anticuerpos monoclonales purificados.

55 (6) Selección de anticuerpos monoclonales

60 Como método de cribado del anticuerpo, resulta posible ejemplificar un método de selección del anticuerpo utilizando una actividad de unión del anticuerpo a un oligómero de A β a modo de índice.

65 La actividad de unión del anticuerpo contra el antígeno (oligómero de A β) puede analizarse utilizando por lo menos uno de los métodos siguientes: método de medición de la absorbancia, método de ensayo de inmunosorción ligada a enzima (método de transferencia de puntos, ELISA), método de inmunoensayo enzimático (EIA), método de radioinmunoensayo (RIA), método de inmunofluorescencia y Biacore (Biacore Life Sciences) utilizando el método de resonancia del plasmón superficial (método SPR).

Específicamente, la unión del anticuerpo monoclonal antioligómero de A β al oligómero de A β puede determinarse mediante el método de transferencia de puntos en el que se preincuban 2,5 μ l de A β 1-42 (2,5 μ g/punto) durante 18 horas, seguido de la inmovilización sobre una membrana de nitrocelulosa. Tras bloquear el sitio de unión no específico sobre la membrana con solución de tampón fosfato que contiene 5% de leche desnatada, 1% de BSA y 0,05% de Tween-20, la membrana se incubó con sobrenadante de cultivo y, de esta manera, pudo detectarse el anticuerpo de unión a oligómero de A β en el sobrenadante de cultivo utilizando anticuerpo de cabra anti-F(ab')₂ de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (1:3.000, Amersham) utilizando un kit de quimioluminiscencia incrementada (ECL) y LAS3000mini (Fujitsu, Tokyo, Japón) (documento n° WO 2009/051220).

El ELISA se llevó a cabo mediante la inmovilización del anticuerpo sobre una placa, añadiendo un antígeno contra el anticuerpo a la laca y añadiendo una muestra que contiene los anticuerpos deseables, tales como el sobrenadante de cultivo de las células productoras del anticuerpo y del anticuerpo purificado. A continuación, se añade un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y se etiqueta con un enzima tal como fosfatasa alcalina y se incuba la placa. Tras el lavado, se añade un sustrato enzimático, tal como p-nitrofenilfosfato, a la placa y se mide la absorbancia para evaluar la capacidad de unión a antígeno de la muestra diana.

Adicionalmente, la reactividad del anticuerpo también puede determinarse mediante la utilización del ensayo de inmunosorción ligada a enzima de tipo sándwich utilizando la quimioluminiscencia (ELISA de quimioluminiscencia) con el fin de detectar específicamente oligómeros de A β y no monómeros de A β en la presente invención (documento n° WO 2009/051220).

Adicionalmente, con el fin de evaluar la eficacia del anticuerpo monoclonal que ha sido administrado en la periferia en ratones in vivo, puede llevarse a cabo un ELISA de oligómero 6E10 específicamente humano marcado con HRP (Senetek PLC, Napa, CA, USA) para el análisis de oligómeros de A β de plasma y órganos recolectados de los ratones en los que se ha realizado la administración en la presente invención (documento n° WO 2009/051220).

Además, resulta posible determinar si el anticuerpo humanizado antioligómero de A β de la presente invención puede unirse a oligómeros de A β en cerebros de EA mediante la realización del experimento de inmunoprecipitación (Ghisso J. et al., Biochem. J., 1993) con una fracción amiloide (Matsubara E. et al., Neurobiol. Aging, 2004) que contiene una gran cantidad de oligómeros de A β (documento n° WO 2009/051220).

(7) Evaluación de actividad de anticuerpos antioligómero de A β

En la presente invención resulta posible determinar que el anticuerpo antioligómero de A β se une específicamente a oligómeros de A β y presenta una actividad citoprotectora mediante incubación de A β para el ensayo de tioflavina (ThT), el ensayo de neurotoxicidad inducido por A β y la medición de la reactividad contra oligómeros de A β con una pluralidad de tamaños moleculares fraccionados mediante ultrafiltración y filtración en gel, la totalidad de los cuales se dan a conocer en Yamamoto N. et al., J. Biol. Chem. 282:2646-2655, 2007, o en el documento n° WO 2009/051220.

Además, la actividad supresora de la formación de fibras de amiloide de A β puede determinarse utilizando el ensayo de ThT y el análisis de microscopía electrónica.

En la presente invención, la capacidad de captura de oligómero de A β de tanto los anticuerpos en cerebros con EA pueden medirse mediante la determinación de la existencia de 4-, 5-, 8- y 12-meros estables en SDS en la inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo humanizado antioligómero de A β .

Además, en la presente invención, entre los ejemplos de un método para la determinación de la capacidad de profilaxis de la patogénesis de tipo EA en un ratón transgénico de PPAswe (Tg2576) se incluye un método en el que el anticuerpo humanizado de la presente invención se administra en el ratón para examinar si puede prevenirse o no la patogénesis de tipo EA, tal como los trastornos de la memoria, las lesiones de placas neuríticas, la disfunción sináptica y la acumulación de A β (documento n° WO 2009/051220).

2. Preparación de anticuerpo recombinante

El método para producir un transformante para expresar establemente un anticuerpo recombinante y el anticuerpo recombinante puede llevarse a cabo tal como se indica a continuación.

(1) Construcción de vector para la expresión de anticuerpo recombinante

Un vector para la expresión de anticuerpo recombinante es un vector de expresión para células animales en el que se han insertado ADN codificantes de CH y CL de un anticuerpo humano y se construye mediante la

clonación de cada ADN codificante de CH y CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para células animales.

5 La región C de un anticuerpo humano puede ser CH y CL de cualquier anticuerpo humano. Entre los ejemplos se incluyen CH perteneciente a la subclase $\gamma 1$, CL perteneciente a la clase κ y similares. Como ADN codificantes de CH y CL de un anticuerpo humano, puede utilizarse un ADN cromosómico que comprende un exón y un intrón o ADNc.

10 Como vector de expresión para las células animales, puede utilizarse cualquier vector de expresión, con la condición de que pueda insertarse en el mismo un gen codificante de las regiones C de un anticuerpo humano y expresarse en el mismo. Entre los ejemplos se incluyen pAGE107 [Cytotechnol. 3:133, 1990], pAGE103 [J. Biochem. 101:1307, 1987], pHSG274 [Gene 27:223, 1984], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527, 1981], pSG1bd2-4 [Cytotechnol. 4:173, 1990], pSE1UK1Sed1-3 [Cytotechnol. 13:79, 1993] y similares.

15 Entre los ejemplos de promotor e intensificador utilizados para un vector de expresión en células animales se incluyen un promotor temprano del SV40 [J. Biochem. 101:1307, 1987], un RTL de virus de la leucemia de Moloney de ratón [Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:960, 1987], un promotor de cadena H de inmunoglobulina [Cell 41:479, 1985] e intensificador [Cell 33:717, 1983] y similares.

20 El vector para la expresión de anticuerpo recombinante puede ser de un tipo en el que existe un gen codificante de una cadena H de anticuerpo y un gen codificante de una cadena L de anticuerpo en vectores separados o de un tipo en el que existan ambos genes en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la sencillez de construcción de un vector para la expresión de anticuerpos recombinantes, de sencillez de introducción en células animales y de equilibrio entre las cantidades de expresión de cadenas H y L de anticuerpo en las células animales, resulta más preferido un tipo tándem de vector para la expresión de anticuerpos recombinantes [J. Immunol. Methods 167:271, 1994].

25 Entre los ejemplos del tipo tándem de vector para la expresión de anticuerpo recombinante se incluyen pKANTEX93 (documento nº 97/1035), pEE18 [Hybridoma 17:559, 1998] y similares.

30 (2) Preparación de ADNc codificante de región V de anticuerpo obtenido de animal no humano y análisis de la secuencia de aminoácidos

35 Se extrajo ARNm de las células de hibridoma productor de un anticuerpo obtenido de un animal no humano para la síntesis del ADNc. El ADNc sintetizado se clonó en un vector y se llevó a cabo el análisis de la secuencia utilizando un secuenciador de ADN con el fin de determinar las secuencias de nucleótidos codificantes de VH y VL.

40 Puede confirmarse si los ADNc obtenidos codifican las secuencias de aminoácidos completas de VL y VH del anticuerpo que contienen una secuencia de señal secretoria mediante la estimación de la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL a partir de la secuencia de nucleótidos determinada y la comparación de las mismas con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991].

45 La longitud de la secuencia de señal secretoria y de la secuencia de aminoácidos N-terminal puede deducirse mediante la comparación entre la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo que comprende una secuencia de señal secretoria y la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] y también puede conocerse el subgrupo al que pertenecen.

50 Además, la secuencia de aminoácidos de cada CDR de VH y VL puede encontrarse mediante la comparación entre las secuencias de aminoácidos obtenidas y las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991].

55 (3) Construcción de vector para la expresión de anticuerpos quiméricos humanos

60 Los ADNc codificantes de VH y VL de anticuerpo de animal no humano se clonan arriba de genes codificantes de CH o CL de anticuerpo humano del vector para la expresión de los anticuerpos recombinantes indicados en (1), anteriormente, construyendo de esta manera un vector para la expresión de anticuerpos quiméricos humanos.

65 Por ejemplo, los ADNc codificantes de VH y VL se diseñan y se construyen para comprender las secuencias conectoras codificantes de los aminoácidos apropiados y que presentan sitios de reconocimiento de enzima de restricción apropiados de manera que se produce una conexión entre el extremo 3' de un ADNc de VH o VL obtenido de un anticuerpo animal no humano y el extremo 5' de CH o CL obtenido de un anticuerpo humano.

Cada ADNc resultante codificante de VH y VL se clonó de manera que cada uno de ellos se expresase en una forma apropiada cadena arriba del gen codificante de CH o CL del anticuerpo humano del vector para la expresión del anticuerpo humanizado indicado en (1), anteriormente, construyendo un vector para la expresión de anticuerpo quimérico humano.

5 Además, el ADNc codificante de VH o VL de animal no humano se amplificó mediante PCR utilizando un ADN sintético que presentaba una secuencia de reconocimiento de un enzima de restricción apropiado en ambos extremos y se clonó cada uno de ellos en el vector de expresión de anticuerpo recombinante indicado en (1), anteriormente.

10 (4) Construcción de ADNc codificante de región V de anticuerpo humanizado

Pueden obtenerse ADNc codificantes de VH o VL de un anticuerpo humanizado de la manera siguiente.

15 En primer lugar, se seleccionan las secuencias de aminoácidos de una región marco (en adelante denominada "FR") en VH o VL de un anticuerpo humano en el que se han trasplantado secuencias de aminoácidos de las CDR en VH o VL de un anticuerpo obtenido de un anticuerpo animal no humano. Pueden utilizarse cualesquiera secuencias de aminoácidos de FR en VH o VL de un anticuerpo humano con la condición de que sean humanas.

20 Entre los ejemplos se incluyen secuencias de aminoácidos de FR en VH o VL de anticuerpos humanos registrados en una base de datos, tal como Protein Data Bank, y secuencias de aminoácidos comunes a subgrupos de FR en VH o VL de anticuerpos humanos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] y similares.

25 Con el fin de inhibir la actividad de unión del anticuerpo, se seleccionaron secuencias de aminoácidos con una homología elevada (de por lo menos 60%) respecto a la secuencia de aminoácidos de FR en VH o VL del anticuerpo original.

30 A continuación, se injertaron las secuencias de aminoácidos de las CDR de VH o VL del anticuerpo original en la secuencia de aminoácidos seleccionada de FR en VH o VL del anticuerpo humano, respectivamente, para diseñar cada secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humanizado.

35 Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convirtieron en secuencias de ADN mediante la consideración de la frecuencia de uso de los codones observada en secuencias de nucleótidos de genes de anticuerpos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] y se diseñó la secuencia de ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humanizado.

(5) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V de los anticuerpos humanizados

40 Es conocido que en el caso de que se produzca un anticuerpo humanizado mediante el injerto simple de únicamente CDR en VH y VL de un anticuerpo obtenido de un animal no humano en FR de VH y VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión a antígenos es inferior a la del anticuerpo original obtenido de un animal no humano [BIO/TECHNOLOGY 9:266, 1991].

45 En los anticuerpos humanizados, entre las secuencias de aminoácidos de las FR en VH y VL de un anticuerpo humano, se identifican los residuos aminoácidos que se relacionan directamente con la unión a antígenos, los residuos aminoácidos que interactúan con un residuo aminoácido en la CDR y los residuos aminoácidos que mantienen la estructura tridimensional de un anticuerpo y que se relacionan indirectamente con la unión a antígenos y se modifican para formar residuos aminoácidos que se observan en el anticuerpo no humano original, incrementando de esta manera la actividad de unión a antígenos que se ha reducido.

50 Con el fin de identificar los residuos aminoácidos relacionados con la actividad de unión a antígeno en la FR, se construye la estructura tridimensional de un anticuerpo para el análisis mediante cristalografía de rayos X [J. Mol. Biol. 112:535, 1977], modelado por ordenador [Protein Engineering 7:1501, 1994] o similares.

55 Además, puede identificarse un anticuerpo humanizado modificado que presenta una actividad de unión a antígenos apropiada mediante la repetición de diversos intentos para producir varios tipos de modificación de cada anticuerpo y el examen de la correlación entre cada uno de los anticuerpos modificados y su actividad de unión a antígeno.

60 La modificación de la secuencia de aminoácidos de la FR en VH y VL de un anticuerpo humano puede llevarse a cabo utilizando diversos ADN sintéticos para la modificación mediante PCR tal como se indica en (4). La secuencia de nucleótidos del producto amplificado por PCR se determina según el método descrito en (2) de manera que se confirma que se ha producido la modificación deseada.

65

(6) Construcción de vector para la expresión de anticuerpos humanizados

Puede construirse un vector para la expresión de anticuerpos humanizados mediante la clonación de cada ADNc codificante de VH o VL de un anticuerpo recombinante construido en posición cadena arriba de cada gen codificante de CH o CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión del anticuerpo recombinante tal como se indica en (1).

Por ejemplo, se introducen secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción apropiados en el extremo 5' de los ADN sintéticos situados en ambos extremos entre los ADN sintéticos utilizados para la construcción de VH o VL del anticuerpo humanizado en (4) y (5) para permitir la clonación de VH o VL en posición cadena arriba de cada gen codificante de CH o CL del anticuerpo humano en el vector de expresión para el anticuerpo humanizado tal como se ha indicado en (1), anteriormente, de manera que se expresan de una forma apropiada.

(7) Expresión transitoria de anticuerpos recombinantes

Con el fin de evaluar eficientemente la actividad de unión a antígenos de los diversos anticuerpos humanizados producidos, los anticuerpos recombinantes pueden expresarse transitoriamente utilizando el vector para la expresión de anticuerpos recombinantes tal como se indica en (3) y (6) o el vector de expresión modificado de los mismos.

Puede utilizarse cualquier célula como célula hospedadora para la introducción del vector de expresión, con la condición de que la célula hospedadora pueda expresar un anticuerpo recombinante. Generalmente, se utilizan células COS-7 (ATCC nº CRL1651) [Methods in Nucleic Acids Res., 283, 1991, CRC Press]. Entre los ejemplos del método para introducir el vector de expresión en células COS-7 se incluyen el método de DEAE-dextrano [Methods in Nucleic Acids Res., 283, 1991, CRC Press], el método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987] y similares.

(8) Establecimiento de transformantes que expresan establemente anticuerpos recombinantes y preparación de anticuerpos recombinantes

Puede obtenerse un transformante que expresa establemente un anticuerpo recombinante mediante la introducción del vector para la expresión de anticuerpos recombinante descrito en (3) y (6) en una célula hospedadora apropiada.

Entre los ejemplos del método para la introducción del vector de expresión en una célula hospedadora se incluyen la electroporación [solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 257891/90; Cytotechnology 3:133, 1990] y similares.

Como célula hospedadora en la que se introduce un vector para la expresión de un anticuerpo recombinante, puede utilizarse cualquier célula, con la condición de que sea una célula hospedadora que pueda expresar el anticuerpo recombinante. Entre los ejemplos se incluyen CHO-K1 (ATCC nº CCL-61), DUKXB11 (ATCC nº CCL-9096), Pro-5 (ATCC nº CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, nº de cat. 11619), células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (también denominadas YB2/0; ATCC nº CRL1662), mieloma NS0 murino, célula de mieloma murino SP2/0-Ag14 (ATCC nº CRL1581), células murinas P3X63-Ag8.653 (ATCC nº CRL1580), células CHO deficientes en gen de dihidrofolato reductasa (en adelante denominado "dhfr") [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:4216, 1980], la línea resistente a lectina Lec13 [Somatic Cell and Molecular Genetics 12:55, 1986], células CHO deficientes en el gen de α 1,6-fucosiltransferasa (documentos nº WO 2005/35586 y nº WO 02/31140) y similares.

Además, también pueden utilizarse células hospedadoras en las que se ha reducido o eliminado la actividad de una proteína, tal como un enzima relacionado con la síntesis de un nucleótido-azúcar intracelular, GDP-fucosa, una proteína tal como un enzima relacionado con la modificación de una cadena sacárida en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en una cadena sacárida de tipo complejo unida por enlace N-glucosídico o una proteína relacionada con el transporte de un nucleótido-azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi, tal como células CHO defectivas en el gen de α 1,6-fucosiltransferasa, tal como se indica en los documentos nº WO05/35586 y nº WO02/31140.

Tras la introducción del vector de expresión, se seleccionan transformantes que expresan establemente un anticuerpo recombinante mediante el cultivo en un medio para el cultivo de células animales que contiene un agente tal como sulfato de G418 (en adelante denominado "G418") (solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 257891/90).

Entre los ejemplos del medio para el cultivo de células animales se incluyen el medio RPMI1640 (fabricado por Invitrogen), medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical), medio EX-CELL301 (fabricado por JRH), medio

IMDM (fabricado por Invitrogen), medio Hybridoma-SFM (fabricado por Invitrogen) y un medio derivado de los mismos que contiene diversos aditivos, tales como FBS.

5 El anticuerpo recombinante puede producirse y acumularse en un sobrenadante de cultivo mediante el cultivo de los transformantes seleccionados en un medio. La cantidad expresada y la actividad de unión a antígenos del anticuerpo recombinante en el sobrenadante de cultivo pueden medirse mediante ELISA o similar.

10 Además, en el transformante, puede incrementarse la cantidad de expresión del anticuerpo recombinante mediante la utilización de un sistema de amplificación de DHFR o similar siguiendo el método dado a conocer en la solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 257891/90.

15 El anticuerpo recombinante puede purificarse a partir del sobrenadante de cultivo del sobrenadante mediante una columna con proteína A [Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, tercera edición, Academic Press, 1996; Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988].

Por ejemplo, el anticuerpo recombinante puede purificarse mediante una combinación de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración y similares.

20 El peso molecular de la cadena H o de la cadena L del anticuerpo recombinante purificado o de la molécula de anticuerpo globalmente se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (en adelante denominada "SDS-PAGE") [Nature 227:680, 1970], transferencia western [Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, tercera edición, Academic Press, 1996; Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] y similares.

25 3. Método de control de la actividad efectora de los anticuerpos

30 Como método para el control de la actividad efectora del anticuerpo humanizado anti-oligómero de A β de la presente invención, se conoce un método de control de la cantidad de fucosa (en adelante denominada "fucosa nuclear") que se encuentra unida en enlace α -1,6 a la N-acetilglucosamina (GlcNAc) presente en el extremo reductor de la cadena sacárida de tipo complejo unida por enlace N-glucosídico que está unida a la asparagina (Asn) en la posición 297 de la región Fc del anticuerpo (documentos nº WO2005/035586, nº WO2002/31140 y nº WO00/61739), un método para el control de la actividad efectora de un anticuerpo monoclonal mediante la modificación de uno o más grupos de aminoácidos de la región Fc del anticuerpo y un método para la generación de una subclase del anticuerpo y similares. La actividad efectora del anticuerpo humanizado antioligómero de A β de la presente invención puede controlarse mediante la utilización de cualquiera de los métodos.

40 La "actividad efectora" se refiere a una actividad dependiente de anticuerpos que se induce mediante una región Fc de un anticuerpo. Como actividad efectora, se conocen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (actividad CDC), la fagocitosis dependiente de anticuerpos (actividad ADP) por células fagocíticas, tales como macrófagos y células dendríticas y similares.

45 Mediante el control del contenido de fucosa nuclear de una cadena sacárida de tipo complejo unida por enlace N-glucosídico de la Fc de un anticuerpo, puede incrementarse o reducirse la actividad efectora del anticuerpo. Como método para reducir el contenido de fucosa que se encuentra unida a una cadena sacárida de tipo complejo unida por enlace N-glucosídico unida a la Fc del anticuerpo, puede obtenerse un anticuerpo al que no se encuentra unida fucosa mediante la expresión del anticuerpo utilizando una célula CHO que es deficiente en un gen codificante de α 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que no se encuentra unido fucosa presenta una actividad ADCC elevada.

50 Por otra parte, según un método para incrementar el contenido de fucosa que se encuentra unida a una cadena sacárida de tipo complejo unida por enlace N-glucosídico unida a la Fc de un anticuerpo, puede obtenerse un anticuerpo al que se encuentra unida fucosa mediante la expresión del anticuerpo utilizando una célula hospedadora en la que se ha introducido un gen codificante de α 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que se une fucosa presenta una actividad de ADCC inferior a la del anticuerpo al que no se encuentra unida fucosa.

55 Además, mediante la modificación del residuo o residuos aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo, puede incrementarse o reducirse la actividad ADCC o la actividad CDC. Por ejemplo, puede incrementarse la actividad CDC de un anticuerpo mediante la utilización de la secuencia de aminoácidos de la región Fc descrita en el documento nº US2007/0148165. Además, la actividad de ADCC o la actividad de CDC puede incrementarse o reducirse mediante la modificación de los aminoácidos tal como se indica en las patentes US nº 6.737.056, nº 7.297.775 o nº 7.317.091.

65 Además, es conocido que entre las subclases de IgG humana, la actividad efectora de las subclases IgG2 e IgG4 es inferior a la de las subclases IgG1 e IgG3. Por lo tanto, puede prepararse un anticuerpo con una actividad efectora más baja mediante la sustitución de la región Fc con la de un anticuerpo de una subclase que presente una actividad efectora más baja.

Con respecto a la estabilización de un anticuerpo de las subclases IgG2 e IgG4, puede prepararse un anticuerpo IgG2 o IgG4 estable en el que se ha controlado la actividad efectora, utilizando los métodos descritos en los documentos n° WO2006/075668, n° WO2006/035586 y similares.

Además, resulta posible obtener un anticuerpo en el que la actividad efectora del anticuerpo ha sido controlada, mediante la utilización de la combinación de los métodos anteriormente indicados para un anticuerpo.

4. Método de tratamiento utilizando anticuerpo anti-oligómero A β de la presente invención

Se ha sugerido que el declive de la memoria que acompaña a la EA se relaciona con la disfunción sináptica causada por los oligómeros de A β solubles [Klein W.L., Trends Neurosci., 2001; Selkoe D.J., Science, 2002]. De acuerdo con lo anterior, existe la posibilidad de que una acumulación y depósito excesivos de oligómeros de A β induzca una compleja cascada posterior que resulte en la EA.

El tratamiento no presenta necesariamente efectos de tratamiento o efectos preventivos perfectos sobre el órgano y el tejido que muestran los síntomas debido al trastorno o enfermedad, pero pueden proporcionar una parte de estos efectos.

El tratamiento de la EA se refiere a la mejora de por lo menos un síntoma que puede producirse debido a la EA. Entre los ejemplos se incluye la mejora o supresión de la disfunción cognitiva, la mejora o la supresión de la formación de placas neuríticas, la mejora o la supresión de la disfunción sináptica y la reducción y la supresión de la acumulación de A β en los tejidos cerebrales, sangre o similares.

En la presente memoria, la disfunción cognitiva incluye, por ejemplo, una memoria a largo/corto plazo deteriorada, una memoria de reconocimiento de objetos deteriorada, una memoria espacial deteriorada y una memoria emocional deteriorada.

Además, el anticuerpo humanizado antioligómero de A β de la presente invención se proporciona para la utilización en un método terapéutico. Entre los ejemplos de método terapéutico que utiliza el anticuerpo humanizado antioligómero de A β de la presente invención se incluyen un método para suprimir la disfunción cognitiva, un método para suprimir la EA, un método para suprimir el avance de la EA, un método para suprimir la formación de placas neuríticas, un método para suprimir la acumulación de A β , un método para neutralizar (suprimir) la actividad neurotóxica, un método para inhibir la formación de fibras de amiloide A β y un método para neutralizar (suprimir) la actividad de toxicidad sináptica.

Además, entre los ejemplos de otras configuraciones se incluye un método para por lo menos una de entre la prevención y el tratamiento de la disfunción cognitiva y un método para por lo menos una de entre la prevención y el tratamiento de la EA.

El agente terapéutico que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de la presente invención o derivados de los mismos puede consistir en únicamente el anticuerpo o fragmento de anticuerpo o derivados de los mismos a modo de ingrediente activo y preferentemente se suministra en forma de una formulación farmacéutica producida mediante un método apropiado bien conocido en el campo técnico de los farmacéuticos, mediante la mezcla del mismo con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Entre los ejemplos de una vía de administración se incluyen la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa.

Entre los ejemplos de la forma de administración se incluyen aerosoles, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, parches y similares.

La preparación farmacéutica adecuada para la administración oral incluye emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares.

Pueden producirse preparaciones líquidas, tales como emulsiones y jarabes utilizando, como aditivos, agua; azúcares, tales como sacarosa, sorbitol y fructosa; glicoles, tales como polietilenglicol y propilenglicol; aceites, tales como aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de soja; antisépticos, tales como ésteres de ácido p-hidroxibenzoico; saborizantes, tales como saborizante de fresa y menta, y similares.

Pueden producirse cápsulas, tabletas, polvos, gránulos y similares utilizando, como aditivos, excipientes tales como lactosa, glucosa, sacarosa y manitol; agentes desintegrantes, tales como almidón y alginato sódico; lubricantes, tales como estearato de magnesio y talco; ligantes, tales como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa y gelatina; surfactantes, tales como éster de ácido graso; plastificadores, tales como glicerina, y similares.

La preparación farmacéutica adecuada para la administración parenteral incluye inyecciones, supositorios, aerosoles y similares.

5 Las inyecciones pueden prepararse utilizando un vehículo, tal como una solución salina, una solución de glucosa y una mezcla de ambos.

Los supositorios pueden prepararse utilizando un vehículo, tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada o ácido carboxílico.

10 Pueden prepararse aerosoles utilizando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención solo o utilizándolo junto con un vehículo que no estimule la membrana mucosa bucal o de las vías respiratorias del paciente y pueda facilitar la absorción del compuesto mediante la dispersión del mismo como partículas finas.

15 El vehículo incluye lactosa, glicerol y similares. Resulta posible producir preparaciones farmacéuticas, tales como aerosoles y polvos secos.

Además, los componentes ejemplificados como aditivos para las preparaciones orales también pueden añadirse a las preparaciones parenterales.

20 **Ejemplo 1**

Preparación de anticuerpo humanizado antioligómero de A β

(1) Diseño de secuencias de aminoácidos para VH y VL del anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4

25 Se diseñaron las secuencias de aminoácidos de la VH del anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4 de la manera siguiente.

30 En primer lugar, se determinó la secuencia de CDR de la secuencia de aminoácidos (SEC ID n° 8) como la VH del anticuerpo monoclonal de ratón antioligómero de A β 6E4, que se preparó en el ejemplo de referencia basándose en el informe de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991. Como resultado, las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de la VH se fijaron como las representadas por las SEC ID n° 1 a n° 3.

35 A continuación, se diseñó una secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4 de la manera siguiente. Con el fin de implantar las secuencias de aminoácidos (SEC ID n° 1 a n° 3) de las CDR 1 a 3 de la VH, se seleccionó la secuencia de aminoácidos de la FR de la VH en el anticuerpo humanizado.

40 Kabat et al. han clasificado las VH de los diversos anticuerpos humanos conocidos en subgrupos (HSG I a III) basados en las homologías de sus secuencias de aminoácidos y han informado las secuencias comunes para cada uno de los subgrupos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991].

45 De esta manera, se buscaron las homologías entre las secuencias de aminoácidos de las FR de las secuencias comunes en los subgrupos I a III de la VH del anticuerpo humano y las secuencias de aminoácidos de las FR de la VH de 6E4. Como resultado de la búsqueda de homologías, se encontraron homologías de HSGI, HSGII y HSGIII de 75,9%, 54,0% y 57,5%, respectivamente. De acuerdo con lo anterior, la secuencia de aminoácidos de la FR de la VH de 6E4 presentaba la homología más alta con el subgrupo I.

50 Basándose en el resultado anteriormente indicado, se injertó cada una de las secuencias de aminoácidos (SEC ID n° 1 a n° 3) de las CDR de VH de 6E4 en posiciones apropiadas en la secuencia de aminoácidos de la FR de la secuencia común en el subgrupo I de la VH del anticuerpo humano. De acuerdo con lo anterior, se diseñó la secuencia de aminoácidos 6E4HV0 (SEC ID n° 12) de la VH del anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4.

55 A continuación, de la misma manera que la cadena H, se decidieron las secuencias de las CDR 1 a 3 de la secuencia de aminoácidos (SEC ID n° 10) de la VH como secuencias de aminoácidos de las SEC ID n° 4 a n° 6, respectivamente, y se diseñó la secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4 de la manera siguiente.

60 Con el fin de injertar las secuencias de aminoácidos (SEC ID n° 4 a n° 6) de las CDR 1 a 3 de la VL del anticuerpo 6E4, respectivamente, se seleccionó la secuencia de aminoácidos de la FR de la VL en el anticuerpo humano.

65 Kabat et al. han clasificado las VL de los diversos anticuerpos humanos conocidos en subgrupos (HSG I a IV) basándose en las homologías de sus secuencias de aminoácidos y han informado de las secuencias comunes

de cada uno de los subgrupos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991].

5 De esta manera, se buscaron las homologías entre las secuencias de aminoácidos de las FR de las secuencias comunes en los subgrupos I a IV de la VL del anticuerpo humano y las secuencias de aminoácidos de las FR de VL de 6E4. Como resultado de la búsqueda de homologías, se encontraron homologías de HSGI, HSGII, HSGIII y HSGIV de 67,5%, 86,3%, 68,8% y 76,3%, respectivamente. De acuerdo con lo anterior, la secuencia de aminoácidos de la FR de VL de 6E4 presentaba la homología más alta con el subgrupo II.

10 Basándose en el resultado anteriormente indicado, se injertó cada una de las secuencias de aminoácidos (SEC ID nº 4 a nº 6) de las CDR de VH de 6E4 en posiciones apropiadas en la secuencia de aminoácidos de la FR de la secuencia común en el subgrupo II de la VL del anticuerpo humano.

15 Sin embargo, Leu en la posición 110 de la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 10) de VL de 6E4 no es el residuo aminoácido que se utiliza más frecuentemente sino el residuo aminoácido que se utiliza con frecuencia relativamente elevada en los sitios correspondientes en las secuencias de aminoácidos de las FR de los anticuerpos humanos ejemplificados en Kabat et al.

20 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se utilizó el residuo aminoácido observado en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 6E4 anteriormente indicado. Tal como se ha indicado anteriormente, se diseñó la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 14) de la VL del anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4, 6E4LV0.

25 La secuencia de aminoácidos diseñada 6E4HV0 de la VH y la secuencia de aminoácidos 6E4LV0 de la VL en el anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4 son las secuencias construidas mediante el injerto de únicamente las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón antioligómero de A β 6E4 en la secuencia de aminoácidos de la FR seleccionada del anticuerpo humano.

30 Sin embargo, en general en la construcción de un anticuerpo humanizado, la actividad de unión se encuentra reducida en muchos casos en que las secuencias de aminoácidos de las CDR del anticuerpo de ratón han sido simplemente implantadas en la FR del anticuerpo humano.

35 Por este motivo, con el fin de evitar la reducción de la actividad de unión, la modificación de los residuos aminoácidos que se considera que afecta a la actividad de unión entre los residuos aminoácidos que están en las FR del anticuerpo humano y que son diferentes de los del anticuerpo de ratón se lleva a cabo junto con el injerto de las secuencias de aminoácidos de las CDR.

40 De esta manera, en el presente Ejemplo, se identificaron los residuos aminoácidos de la FR que se consideraba que afectaban a la actividad de unión, de la manera siguiente.

45 En primer lugar, se construyó utilizando una técnica de modelado por ordenador la estructura tridimensional de una región V de anticuerpo (en adelante denominada HV0LV0) que comprendía la secuencia de aminoácidos 6E4HV0 de la VH y la secuencia de aminoácidos 6E4LV0 de la VL en el anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4 diseñado tal como se ha indicado anteriormente.

50 La construcción de las coordenadas de la estructura tridimensional y la visualización de la estructura tridimensional se llevaron a cabo utilizando Discovery Studio (Accelrys, Inc.) siguiendo las instrucciones adjuntas al mismo. El modelo por ordenador de la estructura tridimensional de la región V en el anticuerpo monoclonal de ratón antioligómero de A β 6E4 también se construyó de la misma manera.

55 Además, se seleccionaron los residuos aminoácidos que eran diferentes de los presentes en 6E4 de entre las secuencias de aminoácidos de la FR en la VH y VL de HV0LV0; se preparó la secuencia de aminoácidos con la modificación de los residuos aminoácidos de 6E4 y se construyó el modelo de estructura tridimensional de la misma manera.

Se compararon dichas estructuras tridimensionales resultantes de las regiones V en 6E4, HV0LV0 y las formas modificadas y se identificaron los residuos aminoácidos que se consideraba que afectaban a la actividad de unión del anticuerpo.

60 Como resultado, como residuos aminoácidos que se consideró que modificaban la estructura tridimensional de los sitios de unión a antígeno y que afectaban a la actividad de unión del anticuerpo de entre los residuos aminoácidos de las FR en HV0LV0, se seleccionó Lys en la posición 12, Val en la posición 20, Arg en la posición 38, Gln en la posición 39, Leu en la posición 45, Met en la posición 48, Arg en la posición 67, Val en la posición 68, Ile en la posición 70, Ala en la posición 72, Thr en la posición 74 y Ala en la posición 97 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 12 en 6E4HV0 e Ile en la posición 2, Pro en la posición 15, Gln en la posición 50 y Tyr en la posición 92 en 6E4LV0, respectivamente.

Se modificó por lo menos una secuencia de aminoácidos de entre dichos residuos aminoácidos seleccionados en los residuos aminoácidos que existían en el mismo sitio en 6E4 y, de esta manera, se diseñó la VH y la VL del anticuerpo humanizado que comprendía una secuencia de aminoácidos que comprendía diversas modificaciones.

Específicamente, en la VH, se introdujo por lo menos una modificación de entre las modificaciones de aminoácidos en las que se había sustituido Lys en la posición 12 por Val, Val en la posición 20 por Leu, Arg en la posición 38 por Lys, Gln en la posición 39 por Leu, Leu en la posición 45 por Phe, Met en la posición 48 por Ile, Arg en la posición 67 por Lys, Val en la posición 68 por Ala, Ile en la posición 70 por Leu, Ala en la posición 72 por Val, Thr en la posición 74 por Lys y Ala en la posición 97 por Thr en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 12.

Además, en la VL, se introdujo por lo menos una modificación de entre las modificaciones de aminoácidos en las que Ile en la posición 2 se había sustituido por Val, Pro en la posición 15 por Leu, Gln en la posición 50 por Lys y Tyr en la posición 92 por Phe en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 14.

Como región V de anticuerpo del anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4 en la que se había modificado por lo menos un residuo aminoácido en la FR de HV0LV0, se diseñaron HV0LV0, HV0LV2a, HV0LV2b, HV0LV2c, HV0LV2d, HV0LV3, HV0LV4, HV2LV0, HV2LV2a, HV2LV2b, HV2LV2c, HV2LV2d, HV2LV3, HV2LV4, HV3LV0, HV3LV2a, HV3LV2b, HV3LV2c, HV3LV2d, HV3LV3, HV3LV4, HV4LV0, HV4LV2a, HV4LV2b, HV4LV2c, HV4LV2d, HV4LV3, HV4LV4, HV5LV0, HV5LV2a, HV5LV2b, HV5LV2c, HV5LV2d, HV5LV3, HV5LV4, HV7aLV0, HV7aLV2a, HV7aLV2b, HV7aLV2c, HV7aLV2d, HV7aLV3, HV7aLV4, HV7bLV0, HV7bLV2a, HV7bLV2b, HV7bLV2c, HV7bLV2d, HV7bLV3, HV7bLV4, HV9LV0, HV9LV2a, HV9LV2b, HV9LV2c, HV9LV2d, HV9LV3, HV9LV4, HV12LV0, HV12LV2a, HV12LV2b, HV12LV2c, HV12LV2d, HV12LV3 y HV12LV4.

Las figuras 1 y 2 muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena H, HV2, HV3, HV4, HV5, HV7a, HV7b, HV9 y HV12, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena L, LV2a, LV2b, LV2c, LV2d, LV3 y LV4, respectivamente.

(2) Producción de anticuerpo humanizado antioligómero de A β

Se diseñó el ADN codificante de la secuencia de aminoácidos en la región variable del anticuerpo humanizado antioligómero de A β con los codones utilizados en los ADN (SEC ID n° 7 y n° 9) codificantes de las secuencias de aminoácidos de VH de 6E4 y de VL de 6E4. En la modificación de los aminoácidos, el ADN se diseñó con los codones utilizados frecuentemente en las células de mamífero.

Las secuencias de ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos de 6E4HV0 y 6E4LV0 en el anticuerpo humanizado antioligómero de A β 6E4 se muestran como SEC ID n° 11 y n° 13, respectivamente. Además, los codones utilizados en los ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos de 6E4VH y 6E4VL se utilizaron para diseñar la región variable con la modificación de aminoácido.

Mediante la utilización de dichas secuencias de ADN se construyó el vector de expresión del anticuerpo humanizado y se expresó el anticuerpo humanizado.

(3) Construcción de ADNc codificante de VH del anticuerpo humanizado antioligómero de A β

Se produjo mediante síntesis química total el ADNc codificante de la secuencia de aminoácidos 6E4HV0 de la VL en el anticuerpo humanizado antioligómero de A β mostrado como la SEC ID n° 12, que había sido diseñado en (1), anteriormente, y LV2a y LV4 mostrados en la figura 2, que habían sido diseñados en el método (2), anteriormente.

(4) Construcción de ADNc codificante de VL de anticuerpo humanizado antioligómero de A β

Se produjo mediante síntesis química total el ADN codificante de la secuencia de aminoácidos 6E4LV0 de la VL en el anticuerpo humanizado antioligómero de A β mostrado como SEC ID n° 14, que había sido diseñado en (1), anteriormente, y LV2a y LV4 mostrados en la figura 2, que habían sido diseñados en el método (2), anteriormente.

(5) Construcción de vectores de expresión de anticuerpo humanizado antioligómero de A β

Se insertaron los ADNc codificantes de 6E4LV0 o HV12 y los ADNc codificante de cualquiera de entre 6E4LV0, LV2a y LV4 obtenidos en (3) y (4), anteriormente, en posiciones apropiadas en el vector de expresión de anticuerpos humanizado pKANTEX93 dado a conocer en el documento n° WO 97/10354 para construir diversos vectores de expresión de anticuerpo humanizado antioligómero de A β .

(6) Expresión de anticuerpo humanizado antioligómero de A β utilizando células animales

La expresión del anticuerpo humanizado antioligómero de A β en células animales se llevó a cabo mediante un método convencional [Antibody Engineering, A Practical Guide, W.H. Freeman and Company, 1992] utilizando los vectores de expresión de anticuerpo humanizado antioligómero de A β obtenidos en (5), anteriormente, para rendir el transformante para la producción del anticuerpo humanizado antioligómero de A β (HV0LV0, HV0LV2a, HV0LV4 y HV12LV4).

Como línea de células animales, se utilizó la línea celular CHO/DG44 obtenida mediante doble inactivación del gen de α 1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (en adelante denominado células CHO con inactivación de FUT8). Se ha conocido que no se añade fucosa a la parte nuclear de la cadena sacárida de tipo complejo unida por enlace N-glucosídico del anticuerpo expresado con dicha cepa de célula hospedadora (documento n° WO 2002/31140).

(7) Preparación de anticuerpo humanizado purificado antioligómero de A β

Tras cultivar el transformante obtenido en (6) del presente ejemplo mediante un método de cultivo convencional, se recolectó la suspensión celular. A continuación, se llevó a cabo una centrifugación durante 20 minutos a 3.000 rpm y a 4°C. Tras la recolección, se esterilizó mediante filtración el sobrenadante del cultivo con un filtro Millex GV con diámetro de poro de 0,22 μ m.

Tras introducir 0,5 ml de Prosep vA High Capacity (fabricado por Millipore Corporation) en una columna de 0,8 cm de diámetro, se pasaron seguidamente 5,0 ml de agua purificada y 5,0 ml de tampón PBS (pH 7,4) para equilibrar el vehículo.

A continuación, tras pasar el sobrenadante de cultivo por la columna, ésta se lavó con 5,0 ml de tampón de PBS (pH 7,4). Tras el lavado, el anticuerpo adsorbido en el vehículo se eluyó con 2,0 ml de tampón citrato 0,1 moles/l (pH 5,0), 2,0 ml de tampón citrato 0,1 moles/l (pH 3,5) y 2,0 ml de tampón citrato 0,1 moles/l (pH 3,0), en este orden.

La elución se obtuvo con 500 μ l en 4 fracciones. Después, se llevó a cabo un análisis de SDS-PAGE de las fracciones purificadas que se habían obtenido de esta manera. Se recolectaron las fracciones en las que se había detectado elución de la proteína diana y se sometieron a diálisis durante un día y noche completos a 4°C utilizando NaCl 150 mmoles/l y solución de citrato de Na 10 mmoles/l (pH 6,0).

Después de la diálisis, se recolectó solución de anticuerpo humanizado antioligómero de A β y se sometió a esterilización mediante filtración utilizando Millex GV (Millipore Corporation) con un diámetro de poro de 0,22 μ m. Se midió la absorbancia a 280 nm (DO280 nm) utilizando un lector de absorbancia (Shimadzu UV-1700) para calcular la densidad de los anticuerpos humanizados purificados antioligómero de A β respectivos.

Como resultado, se produjeron cuatro tipos de anticuerpo humanizado antioligómero de A β que consistían en HV0LV0 que comprendía 6E4HV0 como VH y 6E4LV0 como VL del anticuerpo, HV0LV2a que comprendía 6E4HV0 como VH y LV2a como VL del anticuerpo, HV0LV4 que comprendía 6E4HV0 como VH y LV4 como VL del anticuerpo y HV12LV4 que comprendía HV12 como VH y LV4 como VL del anticuerpo, respectivamente.

Ejemplo 2Producción de antígeno(1) Preparación de oligómeros de A β

Se disolvió proteína amiloide β , péptido 1-42 humano (fabricado por Peptide Institute, Inc.) a una concentración de 1 mmol/l utilizando hexafluoroisopropanol. Tras la sonicación durante 10 minutos, la solución preparada se secó al aire a temperatura ambiente durante la noche.

Después, se añadieron 4 μ l de dimetilsulfóxido a lo anterior y se llevó a cabo una sonicación durante tres minutos. A la solución preparada se añadieron 200 μ l de solución de ácido acético (pH 4,5) y el material resultante se dejó en reposo durante la noche en estático a 4°C para producir los oligómeros de A β .

(2) Preparación de monómeros de A β

Se disolvió biotina-beta-amiloide, 1-40 humano (fabricado por AnaSpec, Inc.) a una concentración de 250 μ moles/l utilizando agua amoniacal al 0,1%. Tras someter la solución preparada a sonicación durante cinco minutos, lo resultante se centrifugó a 16.000 rpm y a 4°C durante 60 minutos. De esta manera se prepararon monómeros de A β mediante la recolección del sobrenadante.

Ejemplo 3Evaluación de la actividad del anticuerpo humanizado antioligómero de A β 5 (1) Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo humanizado antioligómero de A β contra oligómeros de A β utilizando Biacore

10 Con el fin de analizar la actividad de unión de cada uno de los anticuerpos humanizados antioligómero de A β (HV0LV0, HV0LV2a, HV0LV4 y HV12LV4) contra los oligómeros de A β respecto a la cinética química, se llevaron a cabo mediciones de la actividad de unión utilizando el método de resonancia del plasmón superficial (método SPR).

15 Todas las operaciones siguientes se llevaron a cabo utilizando un Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare-Bio-Sciences). Los oligómeros de A β obtenidos en (1) del Ejemplo 2 se inmovilizaron en un chip sensor CM5 (GE Healthcare Bio-sciences) utilizando el método de acoplamiento de aminas.

20 Sobre el chip en el que se inmovilizaron los oligómeros de A β para la medición, se inyectaron secuencialmente muestras preparadas con 8 niveles de densidad mediante la dilución a partir de 30 $\mu\text{g/ml}$ mediante dilución doble de manera escalonada (HV0LV0, HV0LV2a, HV0LV4 y HV12LV4) y se midieron en orden de densidad desde la densidad más baja basándose en el programa automático de multicinética.

25 Mediante la utilización del software de análisis unido al dispositivo, software de Biacore T100 Evaluation (fabricado por Biacore Life Science), se llevó a cabo un análisis con el modelo Bivalent Analyte para calcular la constante de tasa de unión k_a y la constante de tasa de disociación k_d de cada uno de los anticuerpos contra oligómeros de A β .

La constante de tasa de unión k_{a1} , constante de tasa de disociación k_{d1} y constante de disociación K_D ($\text{kd1}/k_{a1}$) obtenidas de esta manera de cada uno de los anticuerpos se muestran en la Tabla 1.

30 Tabla 1. Actividad de unión de anticuerpo humanizado antioligómero de A β a oligómeros de A β

Anticuerpo	k_a (1/MS)	k_d (1/s)	K_D (moles/l)
HV0LV0	$1,7 \times 10^4$	$6,9 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-8}$
HV0LV2a	$6,4 \times 10^3$	$3,9 \times 10^{-4}$	$6,1 \times 10^{-8}$
HV0LV4	$7,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^{-4}$	$7,1 \times 10^{-8}$
HV12LV4	$2,7 \times 10^3$	$8,1 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-7}$

35 Tal como se muestra en la Tabla 1, la totalidad de los anticuerpos humanizados antioligómero de A β (HV0LV0, HV0LV2a, HV0LV4 y HV12LV4) mostró capacidad de unión a oligómeros de A β a una afinidad de entre 3×10^{-17} y 4×10^{-8} moles/l.

40 (2) Evaluación de la actividad de unión de anticuerpo humanizado antioligómero de A β contra monómeros de A β utilizando Biacore

40 Con el fin de analizar la actividad de unión de los anticuerpos humanizados antioligómero de A β respectivos (HV0LV0, HV0LV2a, HV0LV4 y HV12LV4) contra monómeros de A β , se midió la actividad de unión de la misma manera que en (1) del presente Ejemplo. Además, se midió la actividad de unión del anticuerpo anti-A β 6E10 (fabricado por CONVANCE) a modo de anticuerpo de control.

45 Los monómeros de A β obtenidos en (2) del Ejemplo 829 se inmovilizaron en el chip sensor de SA (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences) mediante el método de captura de biotina. Sobre el chip en el que se habían inmovilizado los monómeros de A β , se inyectaron secuencialmente las muestras para las mediciones, que se habían preparado a 5 niveles de densidad mediante la dilución a partir de 30 $\mu\text{g/ml}$ mediante dilución duplicante de manera escalonada (6E10, HV0LV0, HV0LV2a, HV0LV4 y HV12LV4), y se midieron en orden dese la densidad más baja basándose en el programa automático de multicinética. Se muestran los sensogramas en la figura 3.

50 Tal como se muestra en la figura 3, se ha encontrado que ninguno de los cuatro tipos de anticuerpo humanizado antioligómero de A β (HV0LV0, HV0LV2a, HV0LV4 y HV12LV4) muestra capacidad de unión a monómeros de A β .

Ejemplo de referencia

1. Preparación de antígeno

5 Se sintetizó péptido Aβ1-40 para producir un compuesto en el que se combinó químicamente isotiocianato de 6-carboxitetrametilrodamina fluorescente (6-TAMRA) (Sigma) con el extremo N-terminal del mismo. La reacción de polimerización de dicho compuesto se llevó a cabo con péptido Aβ1-40 (Peptide Institute, Inc.) y de esta manera se preparó una preparación (oligómeros de Aβ1-40) que contenía una gran cantidad de oligómeros.

10 2. Establecimiento de hibridoma productor de anticuerpos

El antígeno preparado de la manera anteriormente indicado se utilizó para las inmunizaciones en la almohadilla plantar de ratones B6L-c y posteriormente se llevaron a cabo seis inmunizaciones adicionales. El hibridoma se produjo mediante la fusión con células Sp2/0-Ag14 utilizando el ganglio linfático inguinal con polietilenglicol-1500.

15 3. Análisis de transferencia por puntos

Se llevó a cabo el cribado inicial mediante análisis de transferencia por puntos en el que 2,5 µl de Aβ1-42 (2,5 µg/punto) que habían sido preincubados durante 18 horas se inmovilizaron sobre la membrana de nitrocelulosa. El sitio de unión no específico sobre la membrana se bloqueó con solución de tampón fosfato que contenía leche desnatada al 5%, BSA al 1% y Tween-20 al 0,05% y se incubó el sitio de unión no específico con sobrenadante de solución de cultivo.

20 El anticuerpo unido a oligómero de Aβ en el sobrenadante de cultivo se detectó mediante anticuerpo de cabra anti-F(ab')₂ de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (1:3.000, Amersham) y se ilustra mediante un kit de quimioluminiscencia sensible (ECL) utilizando LAS3000mini (Fujitsu, Tokyo, Japón). Con dicha operación, se estableció el anticuerpo monoclonal de ratón antioligómero de Aβ 6E4.

25 El ejemplo de referencia anteriormente proporcionado se ha dado a conocer en el documento nº PCT/JP2009/52039 (documento nº WO 2009/099176).

30 Texto libre en los listados de secuencias:

- 35 SEC ID nº 1 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HCDR1
- SEC ID nº 2 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HCDR2
- SEC ID nº 3 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HCDR3
- SEC ID nº 4 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de LCDR1
- SEC ID nº 5 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de LCDR2
- SEC ID nº 6 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de LCDR3
- 40 SEC ID nº 11 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN codificante de 6E4HV0
- SEC ID nº 12 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de la región variable 6E4HV0
- SEC ID nº 13 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN codificante de región variable 6E4LV0
- SEC ID nº 14 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable 6E4LV0
- 45 SEC ID nº 15 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable HV12
- SEC ID nº 16 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable LV2a
- SEC ID nº 17 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable LV4

Listado de secuencias

- 50 <110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.
- <120> ANTICUERPO HUMANIZADO ANTIOLIGÓMERO BETA
- <130> W500193
- 55 <150> US 61/232,038
- <151> 2009-08-07
- <160> 17
- 60 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 5
- 65 <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 661 601 T3

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HCDR1

<400> 1
Ser Tyr Trp Met His
 5 **1** **5**

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HCDR2

15 <400> 2
Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Asn Asn Glu Asn Phe Lys
1 **5** **10** **15**

Arg

<210> 3
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HCDR3

25 <400> 3
Asp Gly Asn Tyr Asp Pro Phe Ala Tyr
1 **5**

<210> 4
 30 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de LCDR1

<400> 4
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 **5** **10** **15**

40 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de LCDR2

<400> 5
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 **5**

50 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de LCDR3

ES 2 661 601 T3

<400> 6
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr
 1 5 10

5 <210> 7
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

<400> 7
 cag gtc caa ctc cag cag cct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

tgg atg cac tgg gtg aag ctg agg cct gga caa ggc ttt gag tgg att 144
 Trp Met His Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile
 35 40 45

gga gag att aat cct aga aat ggt ggt act aac aac aat gag aac ttc 192
 Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Asn Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

15 aag aga aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

aca aga gat ggt aac tac gac ccc ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336
 Thr Arg Asp Gly Asn Tyr Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

ctg gtc act gtc tct gca 354
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

20 <210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 661 601 T3

<400> 8

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Asn Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Asp Gly Asn Tyr Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 9

5 <211> 339

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 9

gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt 96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

aat gga aac acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

aca cat gtt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata 336
Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

aaa 339
Lys

ES 2 661 601 T3

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

<400> 10
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

10 Lys

<210> 11
 <211> 354
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: una secuencia de ADN de la región variable 6E4HV0

<400> 11
 cagggtccaac tcgtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
 tctgcaagg ettctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gggcaggcc 120
 cctggccaag gcttgagtg gatgggtgag attaatcctc gaaatggtgg tactaacaac 180
 aatgagaact tcaagcgacg ggtcacaatc actgcagaca catccaccag cacagcctac 240
 atggaactca gcagcctgcg atctgaggac actgcggtct attactgtgc acgagatggt 300
 20 aactacgacc catttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc ttca 354

<210> 12
 <211> 118
 <212> PRT
 25 <213> artificial

<220>
 <223> una secuencia de aminoácidos de la región variable 6E4HV0

ES 2 661 601 T3

<400> 12

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Asn Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Asn Tyr Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 13

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN de región variable 6E4LV0

<400> 13

gatattgtga tgaccaaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttgtga gccagcctcc 60

atctcttgcc gatctagtca gaggcttgta cacagtaatg gcaacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt 180

tctgggggcc cagaccggtt cagtggcagt gggtcagga cagatttcac actcaagatc 240

agccgagtgg aggctgagga tgtgggcgtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300

ccgtacacgt tcggtcaggg gaccaagctg gaaatcaaa 339

15

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> una secuencia de aminoácidos de la región variable 6E4LV0

ES 2 661 601 T3

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

Lys

5

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> una secuencia de aminoácidos de la región variable HV12

<400> 15

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Asn Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Asp Gly Asn Tyr Asp Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 16

<211> 113

ES 2 661 601 T3

<212> PRT
<213> artificial

<220>

5 <223> una secuencia de aminoácidos de la región variable LV2a

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

10 Lys
<210> 17
<211> 113
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> una secuencia de aminoácidos de la región variable LV4

ES 2 661 601 T3

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Lys

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo humanizado que no se une a un monómero de proteína amiloide β y se une a un oligómero de proteína amiloide β , en el que la región variable de cadena pesada de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n°: 12 y la región variable de cadena ligera de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n°: 14.
- 10 2. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, para la utilización en la prevención o el tratamiento de la disfunción cognitiva o la enfermedad de Alzheimer.
- 15 3. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, para la utilización en la supresión de la formación de placas neuríticas o la inhibición de la formación de fibras amiloides de amiloide β .
- 20 4. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, para la utilización en la supresión de la progresión de la enfermedad de Alzheimer.
5. Utilización del anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para la utilización en la prevención o el tratamiento de la disfunción cognitiva.
6. Utilización del anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para la utilización en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
7. Formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, mezclado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

[FIG. 1]

	1	2	3	4	5	6
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
6E4HV0	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYMMHWVROA	PGQGLEWMGE	INPRNGGTNN
HV2		K	V		RQ	F M
HV3		K	V		RQ	F I
HV4		K	V		RQ	F I
HV5		K	V		RL	F I
HV7a		K	V		RL	F I
HV7b		K	V		RQ	F I
HV9		V	V		RL	F I
HV12		V	L		KL	F I

	7	8	9	10	11	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
6E4HV0	NENFKRRVTI	TADTSTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARDG	NYDPFAYWGQ	GTLVTVSS
HV2		RV I	A T		T	
HV3		RV I	A T		T	
HV4		KV I	A T		T	
HV5		KV I	A T		T	
HV7a		KA I	A K		T	
HV7b		KA I	V K		T	
HV9		KA I	V K		T	
HV12		KA L	V K		T	

[FIG. 2]

	1	2	3	4	5	6
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
6E4LV0	DIVMTQSPLS	LPVTEGEPAS	ISCRSSQSLV	HSNGNTYLHW	YLQKPGQSPQ	LLIYKVSNRF
LV2a	I	P				K
LV2b	V	P				Q
LV2c	I	L				Q
LV2d	V	P				K
LV3	I	L				K
LV4	V	L				K

	7	8	9	10	11	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
LV0	SGVPRFSGS	GSGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCSQSTHVP	PYTFGQGTKL	ETK
LV2a				F		
LV2b				F		
LV2c				F		
LV2d				Y		
LV3				F		
LV4				F		

[FIG. 3]

