

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 128**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2011 E 15196358 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 3042917**

54 Título: **Anticuerpos anti péptido Beta Amiloide N3pGlu y usos de los mismos**

30 Prioridad:

12.08.2010 US 373026 P

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

18.04.2018

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**DEMATOS, RONALD;
LU, JIRONG y
TANG, YING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 664 128 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti péptido Beta Amiloide N3pGlu y usos de los mismos

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen selectivamente al péptido Beta Amiloide N3pGlu y a su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el péptido Beta Amiloide (A β , también denominado Abeta).

5 El péptido A β en forma circulante se compone de 38-43 aminoácidos (principalmente 38, 40 o 42 aminoácidos) que resultan de la escisión de una proteína precursora, la proteína precursora amiloide (APP). La conversión de A β de formas solubles a insolubles que tienen un alto contenido de lámina β y la deposición de estas formas insolubles como placas neuríticas y cerebrovasculares en el cerebro se ha asociado con una serie de afecciones y enfermedades, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA), síndrome de Down y angiopatía amiloide cerebral (AAC).

10 Los depósitos encontrados en las placas están compuestos principalmente por una mezcla heterogénea de péptidos A β . A β N3pGlu, también denominado N3pE o A β _{p3-42}, es una forma truncada del péptido A β encontrado solo en placas. A β N3pGlu carece de los dos primeros restos de aminoácido del extremo N-terminal de A β y tiene un pirroglutamato que procede del ácido glutámico en la tercera posición de aminoácido. Aunque el péptido A β N3pGlu es un componente minoritario del A β depositado en el cerebro, los estudios han demostrado que el péptido A β N3pGlu tiene propiedades de agregación agresivas y se acumula temprano en la cascada de deposición.

15 Oliver Wirths y col., "Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases", Journal Neural Transmission, 2010, Vol. 117, n.º 1, páginas 85-96, describe la generación de dos anticuerpos monoclonales que se caracterizan como altamente específicos para péptidos A β _{PE3} que se usan para analizar la deposición en placa en ratones APP PS1KI, un modelo de EA con pérdida neuronal severa y déficit de aprendizaje. Aunque se han descrito previamente anticuerpos policlonales y monoclonales que se dirigen al péptido A β N3pGlu (documentos US 7.122.374 y WO2010/009987), todavía existe una necesidad de anticuerpos monoclonales anti A β N3pGlu de alta afinidad para acoplarse a la diana *in vivo* (es decir, unión a la placa) y, posteriormente, reducir los niveles de placa. Además, dado que los anticuerpos anti A β carboxilo terminales y amino terminales conducen a un aumento de microhemorragia relacionada con la angiopatía amiloide cerebral (AAC), existe la necesidad de anticuerpos anti A β N3pGlu que no den lugar a un aumento de la microhemorragia aunque el tratamiento crónico de como resultado una reducción significativa de la placa depositada.

20 Los anticuerpos dentro del ámbito de la presente invención son antagonistas del péptido A β N3pGlu terapéuticamente útiles que poseen varias propiedades deseables. Los presentes anticuerpos se unen al péptido A β N3pGlu humano con alta afinidad y muestran un descenso de la placa *in vivo* dependiente de la dosis sin un aumento de microhemorragia relacionada con la angiopatía amiloide cerebral (AAC).

25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado por ingeniería genética que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR) en el que LCDR1 es KSX1X2SLLYSRX3KTYLN (SEQ ID NO: 51), LCDR2 es AVSKLX4S (SEQ ID NO: 52), LCDR3 es VQGTHYPFT (SEQ ID NO: 5) y HCDR1 es GYX5FTX6YYIN (SEQ ID NO: 53), HCDR2 es WINPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 es EGX7TVY (SEQ ID NO: 54), en el que X1 es S o T; X2 es Q o R, X3 es G o S, X4 es D o G, X5 es D o T, X6 es R o D y X7 es I, T, E o V.

30 Preferentemente, la composición farmacéutica comprende el anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética de la presente invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 Más preferentemente, el anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo o composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, es para su uso en terapia.

40 El anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es, preferentemente, para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica, enfermedad de Alzheimer prodrómica, síndrome de Down y angiopatía amiloide cerebral (AAC) preclínica o clínica, que comprende la administración a un ser humano que lo necesita el anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética de la presente invención.

45 Preferentemente, el anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una Kd a 25 °C de menos de 1×10^{-9} M para el péptido A β N3pGlu humano. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una Kd a 25 °C de menos de 9×10^{-10} M para el péptido A β N3pGlu humano. En otra realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una Kd a 25 °C de menos de 7×10^{-10} M para el péptido A β N3pGlu humano. En otra realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una Kd a 25 °C entre 9×10^{-10} M y 1×10^{-10} M para el péptido A β N3pGlu humano. En

otra realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una Kd a 25 °C entre 9×10^{-10} M y 1×10^{-10} M para el péptido A β N3pGlu humano. En una realización, la presente invención proporciona además un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una Kd a 25 °C de menos de 1×10^{-9} M o menos de 9×10^{-10} M o menos de 7×10^{-10} M o entre 9×10^{-10} M y 1×10^{-10} M para el péptido A β N3pGlu humano y reduce la placa *in vivo*. En una realización preferida adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una Kd a 25 °C de menos de 1×10^{-9} M o menos de 9×10^{-10} M o menos de 7×10^{-10} M o entre 9×10^{-10} M y 1×10^{-10} M para el péptido A β N3pGlu humano y reduce la placa *in vivo* sin aumentar la microhemorragia relacionada con AAC.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR y una HCVR, en el que LCDR1 es KSX₁X₂SLLYSRX₃KTYLN (SEQ ID NO: 51), LCDR2 es AVSKLX₄S (SEQ ID NO: 52), LCDR3 es VQGTHYPFT (SEQ ID NO: 5) y HCDR1 es GYX₅FTX₆YYIN (SEQ ID NO: 53), HCDR2 es WINPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 es EGX₇TVY (SEQ ID NO: 54), en el que X₁ es S o T; X₂ es Q o R, X₃ es G o S, X₄ es D o G, X₅ es D o T, X₆ es R o D y X₇ es I, T, E o V.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que dicha LCVR comprende polipéptidos LCDR1, LCDR2, LCDR3 y HCVR comprende polipéptidos HCDR1, HCDR2, HCDR3 que se seleccionan del grupo que consiste en:

a) LCDR1 es KSSQSLLYSRGKTYLN (SEQ ID NO: 3), LCDR2 es AVSKLDS (SEQ ID NO: 4), LCDR3 es VQGTHYPFT (SEQ ID NO: 5), HCDR1 es GYDFTRYIN (SEQ ID NO: 6), HCDR2 es WINPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 es EGITVY (SEQ ID NO: 9);

b) LCDR1 es KSSQSLLYSRGKTYLN (SEQ ID NO: 3), LCDR2 es AVSKLDS (SEQ ID NO: 4), LCDR3 es VQGTHYPFT (SEQ ID NO: 5), HCDR1 es GYTFTRYIN (SEQ ID NO: 7), HCDR2 es WINPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 es EGTTVY (SEQ ID NO: 10);

c) LCDR1 es KSSQSLLYSRGKTYLN (SEQ ID NO: 3), LCDR2 es AVSKLDS (SEQ ID NO: 4), LCDR3 es VQGTHYPFT (SEQ ID NO: 5), HCDR1 es GYTFTDYIN (SEQ ID NO: 40), HCDR2 es WINPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 es EGETVY (SEQ ID NO: 41);

d) LCDR1 es KSSQSLLYSRGKTYLN (SEQ ID NO: 3), LCDR2 es AVSKLGS (SEQ ID NO: 35), LCDR3 es VQGTHYPFT (SEQ ID NO: 5), HCDR1 es GYTFTRYIN (SEQ ID NO: 7), HCDR2 es WINPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 es EGTTVY (SEQ ID NO: 10); y

e) LCDR1 es KSTRSLLYSRSKTYLN (SEQ ID NO: 45), LCDR2 es AVSKLDS (SEQ ID NO: 4), LCDR3 es VQGTHYPFT (SEQ ID NO: 5), HCDR1 es GYTFTDYIN (SEQ ID NO: 40), HCDR2 es WINPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 es EGTVY (SEQ ID NO: 46).

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR y una HCVR, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 3, LCDR2 es la SEQ ID NO: 4, LCDR3 es la SEQ ID NO: 5, HCDR1 es la SEQ ID NO: 6, HCDR2 es la SEQ ID NO: 8 y HCDR3 es la SEQ ID NO: 9. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR y una HCVR, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 3, LCDR2 es la SEQ ID NO: 4, LCDR3 es la SEQ ID NO: 5, HCDR1 es la SEQ ID NO: 7, HCDR2 es la SEQ ID NO: 8 y HCDR3 es la SEQ ID NO: 10. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR y una HCVR, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 3, LCDR2 es la SEQ ID NO: 4, LCDR3 es la SEQ ID NO: 5, HCDR1 es la SEQ ID NO: 40, HCDR2 es la SEQ ID NO: 8 y HCDR3 es la SEQ ID NO: 41. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR y una HCVR, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 3, LCDR2 es la SEQ ID NO: 35, LCDR3 es la SEQ ID NO: 5, HCDR1 es la SEQ ID NO: 7, HCDR2 es la SEQ ID NO: 8 y HCDR3 es la SEQ ID NO: 10. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR y una HCVR, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 45, LCDR2 es la SEQ ID NO: 4, LCDR3 es la SEQ ID NO: 5, HCDR1 es la SEQ ID NO: 40, HCDR2 es la SEQ ID NO: 8 y HCDR3 es la SEQ ID NO: 46.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que dichas LCVR y HCVR son polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en:

a. LCVR de SEQ ID NO: 11 y HCVR de SEQ ID NO: 12;

b. LCVR de SEQ ID NO: 11 y HCVR de SEQ ID NO: 13;

c. LCVR de SEQ ID NO: 11 y HCVR de SEQ ID NO: 42;

d. LCVR de SEQ ID NO: 36 y HCVR de SEQ ID NO: 37; y

e. LCVR de SEQ ID NO: 47 y HCVR de SEQ ID NO: 48.

5 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR de SEQ ID NO: 11 y una HCVR de SEQ ID NO: 12. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR de SEQ ID NO: 11 y una HCVR de SEQ ID NO: 13. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR de SEQ ID NO: 11 y una HCVR de SEQ ID NO: 42. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR de SEQ ID NO: 36 y una HCVR de SEQ ID NO: 37. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR de SEQ ID NO: 47 y una HCVR de SEQ ID NO: 48.

La presente invención también proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que los polipéptidos de LC y HC son seleccionados del grupo que consiste en:

- 15 a) LC de SEQ ID NO: 14 y HC de SEQ ID NO: 15;
 b) LC de SEQ ID NO: 14 y HC de SEQ ID NO: 16;
 c) LC de SEQ ID NO: 14 y HC de SEQ ID NO: 44;
 d) LC de SEQ ID NO: 38 y HC de SEQ ID NO: 39; y
 e) LC de SEQ ID NO: 49 y HC de SEQ ID NO: 50.

20 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LC de SEQ ID NO: 14 y una HC de SEQ ID NO: 15. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LC de SEQ ID NO: 14 y una HC de SEQ ID NO: 16. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LC de SEQ ID NO: 14 y una HC de SEQ ID NO: 44. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LC de SEQ ID NO: 38 y una HC de SEQ ID NO: 39. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LC de SEQ ID NO: 49 y una HC de SEQ ID NO: 50.

30 En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 14 y cada HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 15. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 14 y cada HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 16. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 14 y cada HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 44. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 38 y cada HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 39. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 49 y cada HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 50.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende adicionalmente uno o más ingredientes terapéuticos.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar una afección asociada con la actividad del péptido A β , que comprende administrar a un paciente humano que lo necesita un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno de la presente invención.

50 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar una afección seleccionada de un grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica, enfermedad de Alzheimer prodrómica, síndrome de Down y AAC preclínica o clínica, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo. En un aspecto preferido, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar la enfermedad de Alzheimer.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención para su uso en terapia. En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada de enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica, enfermedad de Alzheimer prodrómica, síndrome de Down o AAC preclínica o clínica. En una realización más

preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En otra realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, para su uso en la prevención de una afección seleccionada de enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica, enfermedad de Alzheimer prodrómica, AAC preclínica o clínica. En una realización más preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, para su uso en la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un uso de un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada de un grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica, enfermedad de Alzheimer prodrómica, síndrome de Down y AAC preclínica o clínica. En una realización preferida, la presente invención proporciona un uso de un anticuerpo monoclonal anti A β N3pGlu o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Un anticuerpo de longitud completa es un molécula de inmunoglobulina que comprende 2 cadenas pesadas (H) y 2 cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100-110 aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno a través de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) contenidas en la misma. La porción carboxilo terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

Las CDR se entremezclan con regiones que están conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada región variable de cadena ligera (LCVR) y región variable de cadena pesada (HCVR) se compone de 3 CDR y 4 FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las 3 CDR de cadena ligera se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3" y las 3 CDR de cadena pesada se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3". Las CDR contienen la mayoría de los restos que forman interacciones específicas con el antígeno. La numeración y posicionamiento de los restos de aminoácido de CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR están de acuerdo con la convención de numeración de Kabat bien conocida.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda y se caracterizan por una región constante particular como se conoce en la técnica. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isotipo de un anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, respectivamente. Los anticuerpos IgG se pueden dividir además en subclases, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante particular con una secuencia bien conocida en la técnica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" (Mab) se refiere a un anticuerpo que procede o se aísla de una única copia o clon que incluye, por ejemplo, cualquier eucariota, procariota o clon de fago y no al procedimiento mediante el cual se produce. Los Mab de la presente invención existen, preferentemente, en una población sustancialmente homogénea u homogénea. Los Mab completos contienen 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras. La frase "fragmento de unión a antígeno" incluye, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂ y fragmentos Fv de cadena simple. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden producir, por ejemplo, mediante tecnologías recombinantes, tecnologías de expresión en fagos, tecnologías sintéticas, por ejemplo, injerto de CDR o combinaciones de dichas tecnologías u otras tecnologías conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden inmunizar ratones con anti A β N3pGlu humano o fragmentos del mismo, los anticuerpos resultantes se pueden recuperar y purificar y, se puede evaluar la determinación de si poseen propiedades de unión y funcionales similares o iguales a los compuestos de anticuerpos desvelados en el presente documento mediante los procedimientos desvelados esencialmente como se describe en los ejemplos a continuación. Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden preparar mediante procedimientos convencionales. Los procedimientos para producir y purificar anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, capítulos 5-8 y 15, ISBN 0-87969-314-2.

La frase " anticuerpos humanos diseñados mediante ingeniería genética" se refiere a anticuerpos monoclonales que tienen propiedades funcionales y de unión de acuerdo con la invención y que tienen regiones marco que son sustancialmente humanas o totalmente humanas que circundan CDR derivadas de un anticuerpo no humano. Los "fragmentos de unión a antígeno" de dichos anticuerpos humanos diseñados mediante ingeniería genética incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂ y fragmentos Fv de cadena simple. La "región marco" o "secuencia marco" se refiere a una cualquiera de las regiones marco 1 a 4. Los anticuerpos humanos diseñados mediante ingeniería genética y fragmentos de unión a antígeno de los mismos englobados por la presente invención incluyen moléculas en las que una cualquiera o más de las regiones marco 1 a 4 es sustancialmente o totalmente humana, es decir, en las que está presente cualquiera de las combinaciones posibles de regiones marco individuales sustancialmente o totalmente humanas 1 a 4. Por ejemplo, esto incluye moléculas en las que la región marco 1 y la región marco 2, la región marco 1 y la región marco 3, la región marco 1, 2 y 3, etc., son sustancialmente o totalmente humanas. Son marcos sustancialmente humanos aquellos que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia marco de línea germinal humana conocida.

Preferentemente, los marcos sustancialmente humanos tienen al menos aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia marco de línea germinal humana conocida.

Son marcos totalmente humanos aquellos que son idénticos a una secuencia marco de línea germinal humana conocida. Las secuencias marco de línea germinal humana se pueden obtener de ImMunoGeneTics (IMGT) a través de su página web <http://imgt.cines.fr> o de The Immunoglobulin FactsBook por Marie-Paule Lefranc y Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Por ejemplo, pueden seleccionarse marcos de cadena ligera de línea germinal del grupo que consiste en: A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, LI, L11, L12, L2, L5, L15, L6, L8, O12, O2 y O8 y se pueden seleccionar regiones marco de cadena pesada de línea germinal del grupo que consiste en: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VHI-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VHI-18, VHI-69, VI-13-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59 y VH5-51.

Pueden generarse anticuerpos humanos diseñados mediante ingeniería genética aparte de los desvelados en el presente documento, que exhiben propiedades funcionales similares, usando varios procedimientos diferentes. Los compuestos de anticuerpos específicos desvelados en el presente documento se pueden usar como compuestos de anticuerpos parentales o moldes para preparar compuestos de anticuerpos adicionales. En un enfoque, las CDR del compuesto de anticuerpo parental se injertan en un marco humano que tiene una alta identidad de secuencia con el marco del compuesto de anticuerpo parental. La identidad de secuencia del nuevo marco será, generalmente, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la secuencia del marco correspondiente en el compuesto de anticuerpo parental. Este injerto puede dar como resultado una disminución en la afinidad de unión en comparación con la del anticuerpo parental. Si este es el caso, el marco se puede retromutar al marco parental en ciertas posiciones basándose en criterios específicos desvelados por Queen y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869. Otras referencias que describen procedimientos útiles para humanizar anticuerpos de ratón incluyen las patentes de Estados Unidos N.º 4.816.397; 5.225.539 y 5.693.761; los programas informáticos ABMOD y ENCAD descritos en Levitt (1983) J. Mol. Biol. 168:595-620; y el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann y col. (1988) Nature 332:323-327; y Verhoeyen y col. (1988) Science 239:1534-1536.

La identificación de restos a considerar para una retromutación se puede llevar a cabo de la siguiente manera:

Cuando un aminoácido cae en la siguiente categoría, el aminoácido marco de la secuencia de línea germinal humana que se usa (el "marco aceptor") se reemplaza por un aminoácido marco de un marco del compuesto de anticuerpo parental (el "marco donante"):

- (a) el aminoácido en la región marco humana del marco aceptor es inusual para marcos humanos en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es típica para marcos humanos en esa posición;
- (b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o
- (c) cualquier átomo de la cadena lateral de un aminoácido marco está dentro de aproximadamente 5-6 angstroms (centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional.

Cuando cada uno de los aminoácidos en la región marco humana del marco aceptor y un aminoácido correspondiente en el marco donante es, generalmente, inusual para marcos humanos en esa posición, dicho aminoácido se puede reemplazar por un aminoácido típico para marcos humanos en esa posición. Este criterio de retromutación permite recuperar la actividad del compuesto de anticuerpo parental.

Otro enfoque para generar anticuerpos humanos diseñados mediante ingeniería genética que exhiben propiedades funcionales similares a los compuestos de anticuerpos desvelados en el presente documento implica mutar aleatoriamente aminoácidos dentro de las CDR injertadas sin cambiar el marco y cribando las moléculas resultantes con respecto a la afinidad de unión y otras propiedades funcionales que sean tan buenas o mejores que aquellas de los compuestos de anticuerpos parentales. También se pueden introducir mutaciones sencillas en cada posición de aminoácido dentro de cada CDR, seguido de la evaluación de los efectos de dichas mutaciones en la afinidad de unión y otras propiedades funcionales. Se pueden combinar mutaciones sencillas que producen propiedades mejoradas para evaluar sus efectos en combinación entre sí.

Además, es posible una combinación de ambos enfoques anteriores. Después del injerto de CDR, se pueden retromutar regiones marco específicas además de introducir cambios de aminoácidos en las CDR. Este procedimiento se describe en Wu y col. (1999) J. Mol. Biol. 294:151-162.

Aplicando las enseñanzas de la presente divulgación, una persona experta en la materia puede usar técnicas comunes, por ejemplo, mutagénesis dirigida, para sustituir aminoácidos dentro de las secuencias marco y CDR desveladas en el presente documento y, de este modo, generar secuencias de aminoácidos de la región variable adicionales derivadas de las presentes secuencias. Todos los aminoácidos alternativos de origen natural se pueden introducir en un sitio de sustitución específico. Los procedimientos desvelados en el presente documento se pueden

- utilizar luego para cribar estas secuencias de aminoácidos de la región variable adicionales para identificar secuencias que tienen las funciones *in vivo* indicadas. De este modo, se pueden identificar secuencias adicionales adecuadas para preparar anticuerpos humanos diseñados mediante ingeniería genética y porciones de unión a antígeno de los mismos. Preferentemente, la sustitución de aminoácidos dentro de los marcos se restringe a una, dos o tres posiciones dentro de una cualquiera o más de las 4 regiones marco de cadena ligera y/o cadena pesada desveladas en el presente documento. Preferentemente, la sustitución de aminoácidos dentro de las CDR se restringe a una, dos o tres posiciones dentro de una cualquiera o más de las 3 CDR de cadena ligera y/o cadena pesada. También son posibles combinaciones de los diversos cambios dentro de estas regiones marco y CDR descritas anteriormente.
- El término "tratamiento" (o "tratar") se refiere a los procedimientos que implican una ralentización, interrupción, detención, control, paralización, reducción o inversión de la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente, pero no necesariamente implica una eliminación total de todos los síntomas, afecciones o trastornos relacionados con enfermedades asociadas con el anticuerpo anti A β N3pGlu.
- Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar como medicamentos en medicina humana, administrados mediante una diversidad de rutas. Lo más preferentemente, tales composiciones son para administración parenteral. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a ed. (1995), A. Gennaro y col., Mack Publishing Co.) y comprenden un anticuerpo como el desvelado en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Los resultados de los ensayos siguientes demuestran que los anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención son útiles para el tratamiento de una afección asociada con la actividad del péptido A β tal como la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y AAC.

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos

- Generación inicial de anticuerpos: Se inmunizan ratones transgénicos FVB con el péptido amiloide β 3-42 humano modificado con piroglutamato y truncado en el extremo N terminal (N3pGlu) pretratado a 37 °C durante la noche para formar un agregado. Se cosechan células de bazo de los ratones y se reduce el número de células B reactivas frente a A β 1-40 mediante MACS. Se clasifican las células restantes para unirse al péptido A β N3pGlu agregado. Se aísla ARN de las células B seleccionadas y se convierte en ADNc usando oligo dT. Se obtienen regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo mediante PCR usando cebadores de secuencia señal de anticuerpo y se clonan en vector de fago mediante mutagénesis de Kunkel para fabricar la biblioteca de Fab. La biblioteca de Fab se criba con respecto a la unión al péptido A β N3pGlu agregado mediante ELISA de un solo punto (SPE) y se somete a contra-cribado frente a A β 1-40. Se caracterizan los clones positivos mediante secuenciación de ADN, expresión de fab y unión al péptido A β N3pGlu y falta de unión al péptido A β 1-42 o A β 1-40 soluble.
- Se construyen y criban bibliotecas mutantes de aminoácidos sencillos mediante SPE para unirse al péptido A β N3pGlu agregado, pero no al A β 1-42. Se combinan mutaciones beneficiosas en bibliotecas combinatorias. Se seleccionan y se convierten las variantes combinatorias optimizadas para la afinidad en IgG1 de ratón para la medición de la afinidad mediante BIACORE® y la unión a la placa A β mediante inmunohistoquímica. A partir de un clon identificado, se fabrica la proteína mAb en isotipos IgG1 (mE8) e IgG2a (mE8c) de ratón para estudios de eficacia *in vivo*. mE8 no se une a la secuencia A β N3pGlu de ratón (mpE3-16) o A β 1-42 humana.
- Se utilizan marcos de línea germinal humana VH1-69/JH6 y Vk-A18/JK2 para la humanización inicial. Se injertan CDR del anticuerpo mE8 (con cuatro mutaciones de afinidad) en los marcos humanos, obteniéndose el anticuerpo hE8-C6. Se lleva a cabo una optimización de afinidad adicional en la cadena principal de hE8-C6 y se combinan mutaciones beneficiosas para obtener la variante humanizada de alta afinidad R5, R17, R24 y 2420.
- Segunda ronda de optimización para mejorar la capacidad de desarrollo de fármacos: Dos variantes humanizadas, hE8-C6 y R17, se eligen como cadena principal para una segunda ronda de optimización para mejorar la vida media del suero del anticuerpo mediante la disminución de la unión no específica a células y para aumentar la afinidad del anticuerpo al péptido A β N3pGlu soluble. Se sintetiza un péptido soluble biotinilado que consiste en el aminoácido 14 del extremo N terminal de A β N3pGlu (pE3-16B) y se evalúa si es equivalente al péptido A β N3pGlu para la unión al anticuerpo mE8. Se desarrolla un ensayo de elevación de filtro de alto rendimiento utilizando pE3-16B y se aplica a todos los cribados posteriores de la biblioteca. Se confirman todos los aciertos del cribado de elevación de filtro mediante la unión a A β N3pGlu agregado.
- Se criban de nuevo bibliotecas de variantes de hE8-C6 usando el ensayo de elevación de filtro y se identifica un conjunto de mutaciones beneficiosas. Se utiliza un subconjunto de éstas para fabricar la biblioteca combinatoria. Se seleccionan cuatro variantes combi (Coll-E10, Coll-G2, Coll-G8 y Coll-E2) de este enfoque.
- Se emplea modelado por ordenador para crear modelos estructurales de la región V de hE8-C6, R17, R24 y otras variantes. El análisis de modelo estructural identifica cargas positivas introducidas para la agrupación de optimización de afinidad en el sitio de unión, una causa potencial de unión no específica de anticuerpos a células. Basándose en el modelado, se seleccionan varias posiciones para introducir cambios para equilibrar el potencial

electrostático de la superficie. Se sintetiza una biblioteca combinatoria mediante la combinación de algunas mutaciones beneficiosas del cribado de bibliotecas y los cambios definidos mediante modelado estructural. Se seleccionan tres variantes (R17m-B4, R17m-A12 y R17m-B12) de este esfuerzo para estudios adicionales.

5 El análisis de modelo estructural también descubre un choque estérico entre el resto de marco de cadena ligera Y36 y los restos en la CDR3 de cadena pesada. La mutación Y36L se introduce en la cadena ligera de hE8-C6 para producir la variante hE8L. Se encuentra que este cambio de marco solo tiene un impacto significativo tanto en el aumento de la afinidad del anticuerpo como en la reducción de la unión celular no específica.

10 El otro esfuerzo fue probar un marco humano diferente para la humanización. Se injertan CDR del anticuerpo mE8 en los marcos VH5-51/VKO2 y VH3-23/VKA2. Se determina que el Fab humanizado con VH5-51/VKO2 (hE8-5102) es equivalente, si no mejor, que hE8-C6 en la unión de A β N3pGlu. La introducción de mutaciones beneficiosas adicionales en hE8-5102 genera variantes combi CI-A1, CI-B6, CI-C7 y CI-B8.

Después de pasar todos los ensayos *in vitro*, incluyendo ELISA y BIACORE® para especificidad y afinidad por antígenos, unión celular no específica y tinción de IHC, se seleccionan cinco variantes de mAbs, B12L, CI-C7, hE8L, R17L y R17.

15 Se pueden fabricar y purificar anticuerpos esencialmente de la siguiente manera. Una célula hospedadora apropiada, tal como HEK 293 EBNA o CHO, se transfecta de forma estable o transitoria con un sistema de expresión para secretar anticuerpos usando una relación de vector HC:LC óptima predeterminada o un sistema de vector único que codifica tanto HC, tal como la SEQ ID NO: 56 y la SEQ ID NO: 43 y LC, tal como la SEQ ID NO: 55. El medio clarificado, en el que el anticuerpo se ha secretado, se purifica usando cualquiera de las numerosas técnicas utilizadas comúnmente. Por ejemplo, el medio puede aplicarse convenientemente a una columna de Sepharose FF con proteína A o G que se ha equilibrado con un tampón compatible, tal como tampón fosfato salino (pH 7,4). Se lava la columna para eliminar componentes de unión no específicos. Se eluye el anticuerpo unido, por ejemplo, mediante gradiente de pH (tal como tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8 a tampón citrato de sodio 0,1 M pH 2,5). Se detectan fracciones de anticuerpo, tal como por SDS-PAGE, y luego se combinan. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso previsto. El anticuerpo se puede concentrar y/o filtrar de forma estéril usando técnicas comunes. Se pueden eliminar eficazmente los multímeros y agregados solubles mediante técnicas comunes, que incluyen cromatografía de hidroxipatita, de intercambio iónico, de interacción hidrófoba o de exclusión por tamaño. La pureza del anticuerpo después de estas fases de cromatografía es mayor que 99 %. El producto se puede congelar inmediatamente a -70 °C o se puede liofilizar. Las secuencias de aminoácidos para estos anticuerpos de la presente invención se proporcionan a continuación.

Tabla 1- SEQ ID NO de anticuerpos

Anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	LCVR	HCVR
I (B12L)	14	15	11	12
II (R17L)	14	16	11	13
III (hE8L)	14	44	11	42
IV (R17)	38	39	36	37
V (CI-C7)	49	50	47	48
VI (mE8)	22	23	20	21
VII (mE8c)	22	24		

Ejemplo 2: Afinidad de unión a N3pGlu soluble

35 Se usa resonancia de plasmón superficial medida con el instrumento BIACORE® 2000 para medir la unión de A β N3pGlu a anticuerpos anti N3pGlu. Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos y materiales son de BIACORE® AB (Uppsala, Suecia). Todas las mediciones se realizan a 25 °C. Se disuelven las muestras en tampón HBS-EP (cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P-20 al 0,005 % (p/v) y HEPES 10 mM, pH 7,4).

Se sintetiza una serie de péptidos Abeta con cambios posicionales (mutantes de glicina) para evaluar el impacto de un resto dado sobre la unión a anticuerpo y, por lo tanto, identificar las características y la secuencia requeridas para el reconocimiento del anticuerpo:

Nombre del péptido	Secuencia Abeta 3-16	
pE3-16	Pir-EFRHDSGYEVHHQK-biotina	SEQ ID NO: 25
E3-16	EFRHDSGYEVHHQK-biotina	SEQ ID NO: 26
pEG4	Pir-EGRHDSGYEVHHQK-biotina	SEQ ID NO: 27
mpE3-16	Pir-EFGHDSGFVHHQK-biotina (roedor)	SEQ ID NO: 28

(continuación)

Nombre del péptido	Secuencia Abeta 3-16	
pEG6	Pir-EFRGDSGYEVHHQK-biotina	SEQ ID NO: 29
pEG7	Pir-EFRHGSGYEVHHQK-biotina	SEQ ID NO: 30
pEG8	Pir-EFRHDGGYEVHHQK-biotina	SEQ ID NO: 37
pEF10	Pir-EFRHDSGFVHHQK-biotina	SEQ ID NO: 39

La importancia de una forma modificada y troncada (des 1,2) de ácido glutámico (3 pir-E o 3 pir-Glu) se evalúa mediante la comparación de la unión A β 1-42 frente a A β 3-16 frente a pE3-16 (SEQ ID NO: 1 frente a SEQ ID NO: 26 frente a SEQ ID NO: 25 respectivamente). Se disuelven los péptidos en PBS a 5 mg/ml antes de la dilución para experimentos de unión.

Se evalúa la unión usando ciclos analíticos múltiples de captura de anticuerpos, asociación/inyección de péptidos, flujo de tampón prolongado para disociación y regeneración de superficie. Para la fase de captura de anticuerpo, dependiendo del tipo de anticuerpo a capturar, se inmoviliza una micromatriz CM5 con proteína A o Fc de cabra anti ratón. Excepto para anticuerpos de ratón, cada ciclo consiste en: inyección de ~5-7 μ l de anticuerpo anti N3pGlu 10 μ g/mL a 5 μ l/min (aplicación de captura 3.000 RU), inyección de 100 μ l de péptido a 50 μ l/min (1000 nM - 62,5 nM en diluciones seriadas a la mitad para cada ciclo), seguido de 10 minutos para la disociación. Para un anticuerpo de ratón, la velocidad de flujo es 50 μ l/min y se inyectan 20 μ l de anticuerpo de ratón a 50 μ g/ml. En ambos casos, se regenera la superficie de la micromatriz usando 20 μ l de hidrócloruro de glicina 10 mM, pH 1,5. Luego se obtiene la afinidad de unión (K_D) a partir de la tasa de disociación y asociación para cada ciclo usando un modelo de unión 1:1 en el software de análisis BIAevaluation. Los anticuerpos anti N3pGlu, B12L y R17L y el anticuerpo de ratón precursor (mE8C) reconocen A β N3pGlu específicamente, con una K_D menor de 1 nM. Los anticuerpos anti N3pGlu, B12L y R17L y el anticuerpo de ratón precursor (mE8C) también se unen a pE3-16 con afinidad similar, indicando que el epítipo se localiza dentro de esta región de los péptidos. El análisis de unión de anticuerpos a péptidos mutantes de glicina muestra que los restos críticos para la unión eran de 3 a 7: piroE en posición 3, F en posición 4, R en posición 5, H en posición 6, D en posición 7. No se detecta unión detectable a A β ₁₋₄₀ para los anticuerpos de la presente invención.

Ejemplo 3: Afinidad de unión a N3pGlu agregado

También se realizan experimentos con BIACORE® para controlar la unión de anticuerpos anti N3pGlu a A β N3pGlu agregado. En este experimento, se inmoviliza el péptido A β N3pGlu a diferentes densidades en celdas de flujo 2 (densidad baja, LD), 3 (densidad media, MD) y 4 (densidad alta, HD) en una micromatriz CM-5 a través de la química de acoplamiento de amina. Se inmovilizan diferentes niveles de péptido A β N3pGlu para examinar el impacto de la densidad de superficie en la unión a anticuerpos anti N3pGlu. Tras la inmovilización, la mayor parte de N3pGlu se agrega en la superficie, como lo demuestra la falta de la unión a un Mab de control que solo reconoce el péptido monomérico. Esta forma agregada del péptido simula la propiedad del péptido abeta agregado en forma de amiloide o fibrilla, en el que la región N terminal de los péptidos está expuesta y se puede establecer como diana con anticuerpos.

La unión se evalúa usando múltiples ciclos analíticos a 25 °C. Cada ciclo se realiza a un caudal de 50 μ l/min y consiste en las siguientes fases: inyección de 250 μ l de solución de anticuerpo N3pGlu (comenzando a 500 nM y utilizando diluciones seriadas a la mitad para cada ciclo) seguido de 20 minutos para la disociación y regeneración usando ~30 μ l de hidrócloruro de glicina 10 mM, pH 1,5. La tasa de asociación y disociación para cada ciclo se evalúan usando un modelo de ligando heterogéneo en el software BIAevaluation. Como el modelo de unión 1: 1 no se ajusta a los datos, el ajuste heterogéneo produce dos afinidades de unión (una afinidad baja y una alta). Los anticuerpos R17L y B12L y el anticuerpo mE8c murino precursor se unen al A β N3pGlu agregado con alta afinidad $K_{D,1} < 100$ pM y una menor afinidad $K_{D,2} < 10$ nM. La señal de unión máxima (R_{max}) se calculó como la suma de R_{max} de la unión de alta y baja afinidad. Se muestra que R_{max} aumenta a medida que aumenta la densidad del péptido en la superficie, como se esperaba ya que hay más sitios de unión disponibles en una superficie de mayor densidad. Estos estudios de unión demuestran que los anticuerpos de la presente invención se unen al A β N3pGlu agregado.

Ejemplo 4: Estudios de acoplamiento con la diana Ex Vivo

Se realizan análisis inmunohistoquímicos con anticuerpos A β añadidos exógenamente con el fin de determinar el acoplamiento con la diana ex vivo en secciones cerebrales de un cerebro PDAPP fijado (de 24 meses de edad). Se ha demostrado que el ratón transgénico PDAPP desarrolla gran parte de la patología asociada con la enfermedad de Alzheimer. Para anticuerpos murinos, se usó una etiqueta de biotina como marcador ya que este experimento se realizó en tejido murino y, por lo tanto, no es apropiada una comparación directa entre los anticuerpos anti N3pGlu no murinos no biotinilados. El anticuerpo 3D6 N terminal (1-5) biotinilado marca fuertemente cantidades significativas de A β depositado en el hipocampo de PDAPP, mientras que el mE8 biotinilado marca solo un subconjunto de depósitos. A diferencia del cerebro humano con EA, la inmensa mayoría de A β depositado en el cerebro de PDAPP es de longitud completa. Se observa un marcado de placa similar para los anticuerpos anti N3pGlu no biotinilados,

tales como B12L y R17L (en comparación con el mE8). No se observa un marcado de placa específico para IgG de control humanas ni de ratón. Debido a que la composición y la estructura probable del A β depositado es radicalmente diferente en el cerebro EA, se investigan los anticuerpos anti N3pGlu no biotinilados (3 ug/ml) para determinar si se unen a A β depositados en secciones cerebrales de un cerebro EA recién congelado. El anticuerpo de control positivo (3D6 biotinilado) marca intensamente muchas placas A β en el cerebro EA, mientras que los anticuerpos de control negativos (IgG humano y murino) carecen de cualquier unión apreciable. Varios de los anticuerpos anti N3pGlu no biotinilados tales como B12L y R17L se unen de forma similar a los A β depositados. Estos estudios histológicos demuestran que los anticuerpos anti N3pGlu de la presente invención pueden acoplarse a la diana de A β depositada ex vivo.

10 **Ejemplo 5: Estudios de acoplamiento con la diana in vivo**

Se mide la capacidad de los anticuerpos anti N3pGlu para acoplarse con la diana depositada in vivo. Se realiza un estudio subcrónico de 4 semanas con anticuerpos murinos biotinilados 3D6 y mE8c a 40 mg/kg administrados por vía intraperitoneal (IP) semanalmente. Se recogen los cerebros al término del experimento y el nivel de acoplamiento con la diana se determina mediante examen histológico del cerebro. Los animales inyectados con el 3D6 biotinilado tienen un marcado de placa solo a lo largo de la fisura del hipocampo, mientras que los ratones inyectados con mE8c biotinilado expresan un marcado de placas fuerte en el hipocampo y las regiones corticales. Se observan patrones de acoplamiento con la diana muy similares en un ensayo de 3 días más agudo (tinción de fisura de hipocampo 3D6 y marcaje de mE8 en hipocampo y regiones corticales). Estos resultados sugieren fuertemente que el anticuerpo 3D6, que se une tanto a A β soluble como insoluble, se satura con A β soluble y, por lo tanto, no puede acoplarse con la diana depositada deseada. En marcado contraste, el anticuerpo murino anti N3pGlu mE8c se acopla consistentemente con la diana prevista en ambas regiones críticas del cerebro. Se evalúan dosis altas y bajas de los anticuerpos anti N3pGlu R17L y B12L en un estudio in vivo de 3 días similar. Se inyectan los anticuerpos IP a 10 mg/kg (dosis baja) o 40 mg/kg (dosis alta). Al final del estudio, se recogen el plasma y los cerebros y se determina la PK del plasma. Se seccionan los cerebros y se realiza la inmunohistoquímica en secciones hermanas con un anticuerpo antihumano (para detectar el anticuerpo anti N3pGlu unido) y 3D6 (para detectar la cantidad total de diana depositada en la sección). A fin de una mejor cuantificación del nivel de acoplamiento con la diana in vivo, el porcentaje de área unida por el anticuerpo anti N3pGlu se normaliza frente al % de área total de posible diana (A β depositado total visualizado mediante inmunohistoquímica 3D6 exógena). Adicionalmente, el porcentaje global de acoplamiento con la diana se normaliza frente a los valores farmacocinéticos del plasma (PK) para cada ratón individual, ya que se detectan exposiciones significativas al término del estudio. Se encuentra que los anticuerpos anti N3pGlu tanto R17L como B12L se acoplan con la placa depositada con una distribución similar a la observada con el anticuerpo anti N3pGlu murino (mE8). Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti N3pGlu R17L y B12L, cuando se administran periféricamente, pueden cruzar la barrera sangre-cerebro y acoplarse con la diana prevista del A β depositado, mientras que un anticuerpo que se une tanto a A β soluble como insoluble se satura con el soluble y no puede acoplarse con la diana depositada prevista.

Ejemplo 6: Estudios de reducción de placas terapéuticas

Se realiza un estudio de reducción de placas terapéuticas en ratones PDAPP de 23 meses de edad con los anticuerpos siguientes: anticuerpo de control negativo (IgG2a), 3D6, mE8 (IgG1) y mE8c (IgG2a). Se inyectan subcutáneamente los ratones PDAPP envejecidos con 12,5 mg/kg de cada anticuerpo semanalmente durante tres meses. Se realiza una necropsia a un grupo de ratones al principio del estudio (tiempo cero) a fin de determinar la carga de placa inicial a los 23 meses de edad. Al final del estudio, se obtiene plasma y se procesan los cerebros para obtener resultados bioquímicos e histológicos (un hemisferio cada uno). Se homogeneizan el hipocampo y las regiones corticales en guanidina 5 M y se mide el contenido A β mediante geles de urea ácida seguido por transferencia de Western. Un análisis de los lisados de guanidina del hipocampo de las cohortes de tiempo cero de 23 meses de edad y anticuerpo de control negativo (de 26 meses de edad) muestran un aumento no significativo en A β_{1-42} depositado; confirmando así que los cerebros de los ratones PDAPP están en la meseta de placa. De forma similar a los estudios previos en ratones PDAPP envejecidos, el tratamiento con el anticuerpo comparador 3D6 no tiene efecto sobre la reducción de placa. El tratamiento con anticuerpo N3pGlu, mE8 o mE8c, da como resultado una reducción de placa significativa comparado con el anticuerpo de control negativo IgG2a ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente) (Tabla 2). El mE8 y mE8c reduce el A β_{1-42} del hipocampo en ~38 % y ~53 %, respectivamente. El anticuerpo N3pGlu mE8c con función efectora máxima tiende a ser más eficaz que el anticuerpo con función efectora mínima mE8 (en comparación con el control), sin embargo, esta diferencia no alcanza significación estadística. También, el anticuerpo mE8c tiene una disminución significativa de ~30 % de A β_{1-42} en el hipocampo comparado con los ratones de tiempo cero (prueba t; $p < 0,0066$), por lo tanto indica la eliminación de placa depositada previamente. Los análisis de los lisados de guanidina cortical producen resultados muy similares con la excepción de que solo el mE8c con función efectora máxima disminuye significativamente la deposición de A β_{1-42} . Estos resultados demuestran que el tratamiento crónico con anticuerpos N3pGlu de este ejemplo disminuye significativamente la deposición de placa en ratones PDAPP envejecidos de una forma dependiente de la función efectora. Adicionalmente, estos resultados apoyan la hipótesis de que el acoplamiento con la diana deficiente para anticuerpos A β que se unen tanto a A β solubles como insolubles (en oposición a la senescencia) fue el factor causante de su falta de eficacia cuando se usa en paradigmas terapéuticos.

Tabla 2- Reducción de placas de hipocampo y corteza (ng de A β ₁₋₄₂ de peso húmedo)

Placa de hipocampo de ratones PDAPP de 23 a 26 meses de edad					
	Control tiempo cero	Control negativo - IgG2a	m3D6	mE8 - IgG1	mE8c - IgG2a
Número de valores	15	27	30	27	23
Media	48,13	71,96	66,73	44,25	33,62
Desviación típica	17,12	39,4	29,48	19,64	13,8
Error típico	4,42	7,583	5,383	3,78	2,877
Placa de corteza de ratones PDAPP de 23 a 26 meses de edad					
	Control tiempo cero	Control negativo - IgG2a	m3D6	mE8 - IgG1	mE8c - IgG2a
Número de valores	15	27	30	27	24
Media	34,43	41,93	40,46	33,66	27,52
Desviación típica	16,14	19,98	18,14	14,91	16,95
Error típico	4,168	3,845	3,313	2,869	3,459

Ejemplo 7: Análisis de microhemorragia en ratones PDAPP envejecidos

Se realiza un estudio histológico para investigar si el mecanismo de acción de los anticuerpos N3pGlu que conduce a la reducción de la placa disminuida en ratones PDAPP envejecidos daría como resultado una exacerbación de la microhemorragia relacionada con AAC. Estudios previos han demostrado que el tratamiento de ratones transgénicos APP envejecidos con varios anticuerpos anti A β amino terminal y carboxilo terminal conducirá a un aumento en la microhemorragia relacionada con AAC (Pfeifer y col. 2002; Wilcock y col. 2004; Racke y col. 2005). Aunque el mecanismo subyacente a este posible evento adverso no está claro, se han propuesto dos hipótesis que no se excluyen mutuamente: la redistribución de A β en los vasos sanguíneos cerebrales (Wilcock y col. 2004) o la unión directa de anticuerpos a AAC existente (Racke y col. 2005). Análisis bioquímicos e histológicos demuestran que A β _{p3-x} es un constituyente de AAC en pacientes EA y ratones PDAPP envejecidos. Se realiza un análisis histológico detallado para microhemorragia en ratones PDAPP envejecidos (23 a 26 meses de edad) que se han tratado terapéuticamente con anticuerpos de control y N3pGlu durante tres meses con inyecciones vía subcutánea semanalmente de 12,5 mg/kg. El control positivo para los análisis de microhemorragia es animales tratados crónicamente con 3D6 que han demostrado previamente que este anticuerpo anti A β amino terminal exagera significativamente la microhemorragia (Racke y col. 2005). Al final del estudio, medio cerebro de cada animal se fija a gotas en formaldehído al 4 % y se inserta en parafina. Las secciones coronales que abarcan 2 mm de tejido se seccionan en 50 cortes (cuatro secciones de 10 μ m por corte). Once cortes de intervalos homogéneos a través de los 2 mm de tejido se tiñen con Perls Blue a fin de visualizar hemosiderina (acumulación de hierro celular debido a microhemorragia). Se recuentan manualmente dos secciones por corte con un diseño ciego. El tratamiento crónico de ratones PDSAPP envejecidos con 3D6 (control positivo) aumenta notablemente la microhemorragia (p<0,001). De forma importante, esto demuestra que el tratamiento con mE8 (IgG1) o mE8c (IgG2a) no exagera la microhemorragia, aunque estos anticuerpos N3pGlu reducen significativamente el A β depositado en estos animales. Estos resultados demuestran que los anticuerpos N3pGlu de este ejemplo no exageran la microhemorragia relacionada con AAC en ratones PDAPP envejecidos.

Listado de secuencias

- <SEQ ID NO: 1; PRT1; Artificial> DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (A β 1-42)
- <SEQ ID NO: 2; PRT1; Artificial> [pE]FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (N3pE A β)
- <SEQ ID NO: 3; PRT1; Artificial> KSSQSLLYSRGKTYLN (LCDR1-B12L/R17L/hE8L/R17)
- <SEQ ID NO: 4; PRT1; Artificial> AVSKLDS (LCDR2 - B12L/R17L/hE8L/CI-C7)
- <SEQ ID NO: 5; PRT1; Artificial> VQGTHYPFT (LCDR3 - B12L/R17L/hE8L/R17/CI-C7)
- <SEQ ID NO: 6; PRT1; Artificial> GYDFTRYIIN (HCDR1 - B12L)
- <SEQ ID NO: 7; PRT1; Artificial> GYTFTRYIIN (HCDR1 - R17L/R17)
- <SEQ ID NO: 8; PRT1; Artificial> WINPGSGNTKYNEKFKG (HCDR2 - B12L/R17L/R17/CI-C7)
- <SEQ ID NO: 9; PRT1; Artificial> EGITVY (HCDR3 - B12L)
- <SEQ ID NO: 10; PRT1; Artificial> EGTTVY (HCDR3 - R17L/R17)
- <SEQ ID NO: 11; PRT1; Artificial> (LCVR - B12L/R17L/hE8L)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIK

<SEQ ID NO: 12; PRT1; Artificial> (HCVR - B12L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYDFTRYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGN
TKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGITVYWGQGTITVTVSS

<SEQ ID NO: 13; PRT1; Artificial> (HCVR - R17L)

5

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNT
KYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGITVYWGQGTITVTVSS

<SEQ ID NO: 14; PRT1; Artificial> (LC - B12L/R17L)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS
STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO: 15; PRT1; Artificial> (HC - B12L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYDFTRYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGN
TKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGITVYWGQGTITVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVHLQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

<SEQ ID NO: 16; PRT1; Artificial> (HC - R17L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNT
KYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGITVYWGQGTITVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVHLQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

<SEQ ID NO: 17; ADN; Artificial> (LCVR ADN-B12L/R17L)

GATATTGTGATGACTCAGACTCCACTCTCCCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCT
CCATCTCCTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTCGCGGAAAAACCTATTTGAA
TTGGCTCCTGCAGAAGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTTATGCGGTGTCTAAA
CTGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTTCAGGCACAGATTTACA
CTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCCGAAGATGTTGGGGTTTATTACTGCGTGCAAGGT
ACACATTACCCATTACGTTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

<SEQ ID NO: 18; ADN; Artificial> (HCVR ADN-B12L)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAG
GTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACGACTTCACTAGATACTATATAAACTGGGTGCGAC
AGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTAATCCTGGAAGCGGTAATA
CTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGA
GCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT
GTGCGAGAGAAGGCATCACGGTCTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
CA

5 <SEQ ID NO: 19; ADN; Artificial> (HCVR ADN-R17L)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAG
GTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACACCTTCACTAGATATTATATAAACTGGGTGCGAC
AGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTAATCCTGGAAGCGGTAATA
CTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGA
GCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT
GTGCGAGAGAAGGCACAACGGTCTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
CA

<SEQ ID NO: 20; PRT1; Artificial> (LCVR - mE8)

NIVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYAVSKLDSG
VPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHYPFTFGSGTKLEIK

<SEQ ID NO: 21; PRT1; Artificial> (HCVR - mE8)

10 EVQLLESPELVKPGASVKISKASGYTFTDYINWVKQRPQGLEWIGWINPGSGNTK
YNEKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCTREGETVYWGQGTTLTVSS

<SEQ ID NO: 22; PRT1; Artificial> (LC - mE8 y mE8c)

NIVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYAVSKLDSG
VPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFP
PSSEQLTSGGASVVCFLNFPKINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSST
LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

<SEQ ID NO: 23; PRT1; Artificial> (HC - mE8)

EVQLLESGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGWINPGSGNTK
YNEKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCTREGETVYWGQGTTLTVSSAKT
TPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT
LSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK
DVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM
HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMI
TDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSV
LHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

<SEQ ID NO: 24; PRT1; Artificial> (HC - mE8c)

EVQLLESGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGWINPGSGNTK
YNEKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCTREGETVYWGQGTTLTVSSAKT
TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT
LSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIF
PPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV
SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQV
TLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERN
SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

5 <SEQ ID NO: 25; PRT1; Artificial> (pE3-16) Pir-EFRHDSGYEVHHQK-biotina

<SEQ ID NO: 26; PRT1; Artificial> (E3-16) EFRHDSGYEVHHQK-biotina

<SEQ ID NO: 27; PRT1; Artificial> (pEG4) Pir-EGRHDSGYEVHHQK-biotina

<SEQ ID NO: 28; PRT1; Artificial> (mpE3-16) Pir-EFGHDSGFVHHQK-biotina

<SEQ ID NO: 29; PRT1; Artificial> (pEG6) Pir-EFRGDSGYEVHHQK -biotina

10 <SEQ ID NO: 30; PRT1; Artificial> (pEG7) Pir-EFRHSGGYEVHHQK-biotina

<SEQ ID NO: 31; PRT1; Artificial> (LCVR - hE8-C6)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYAVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIK

<SEQ ID NO: 32; PRT1; Artificial> (HCVR - hE8-C6)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNT
KYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGETVYWGQGTTLTVSS

15 <SEQ ID NO: 33; PRT1; Artificial> (LC - hE8-C6)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYAVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS
STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO: 34; PRT1; Artificial> (HC - hE8-C6)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNT
KYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGETVYWGQGTITVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV

FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVHLHQLDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTA
KNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

<SEQ ID NO: 35; PRT1; Artificial> (LCDR2 - R17) AVSKLGS

5 <SEQ ID NO: 36; PRT1; Artificial> (LCVR - R17)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYAVSKLGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIK

<SEQ ID NO: 37; PRT1; Artificial> (pEG8) Pir-EFRHDGGYEVHHQK-biotina

<SEQ ID NO: 38; PRT1; Artificial> (LC - R17)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYAVSKLGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 <SEQ ID NO: 39; PRT1; Artificial> (pEF10) Pir-EFRHDSGFVHHQK-biotina

<SEQ ID NO: 40; PRT1; Artificial> (HCDR1 - hE8L/CI-C7)

GYTFTDYYIN

<SEQ ID NO: 41; PRT1; Artificial> (HCDR3 - hE8L) EGETVY

<SEQ ID NO: 42; PRT1; Artificial> (HCVR - hE8L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNT
KYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGETVYWGQGTITVTVSS

15

<SEQ ID NO: 43; ADN; Artificial> (HC ADN-R17L)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAG
 GTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACACCTTCACTAGATATTATATAAACTGGGTGCGAC
 AGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTAATCCTGGAAGCGGTAATA
 CTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGA
 GCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT
 GTGCGAGAGAAGGCACAACGGTCTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
 CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCTCCTCCAAGAGCACCTC
 TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
 GGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTT
 ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAC
 AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA
 CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
 TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
 CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
 TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
 CCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC
 TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
 CCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
 TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
 CTCCTGTCTCCGGGT

<SEQ ID NO: 44; PRT1; Artificial> (HC - hE8L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNT
KYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGETVYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ<SEQ ID NO: 45; PRT1; Artificial> (LCDR1 - CI-C7) KSTRSLLYSRSKTYLN

5 <SEQ ID NO: 46; PRT1; Artificial> (HCDR3 - CI-C7) EGVTVY

<SEQ ID NO: 47; PRT1; Artificial> (LCVR - CI-C7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSTRSLLYSRSKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAVSKLD
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVQGTHYPFTFGGGTKVEIK

<SEQ ID NO: 48; PRT1; Artificial> (HCVR - CI-C7)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTDYINWVRQMPGKGLEWMGWINPGSGNT
KYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAREGVTVYWGQGLVTVSS

<SEQ ID NO: 49; PRT1; Artificial> (LC - CI-C7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSTRSLLYSRSKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAVSKLDS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVQGTHYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

<SEQ ID NO: 50; PRT1; Artificial> (HC - CI-C7)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTDYINWVRQMPGKGLEWMGWINPGSGNT
KYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAREGVTVYWGQGLVTVSSA
STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

<SEQ ID NO: 51; PRT1; Secuencia Artificial> (LCDR1 consenso) $K S x_1 x_2 S L L Y S R x_3 K T Y L N$ en la que x_1 es S o T, x_2 es Q o R, x_3 es G o S

10

<SEQ ID NO: 52; PRT1; Secuencia Artificial> (LCDR2 consenso) $A V S K L x_4 S$ en la que x_4 es D o G

<SEQ ID NO: 53; PRT1; Secuencia Artificial> (HCDR1 consenso) $G Y x_5 F T x_6 Y Y I N$ en la que x_5 es D o T, x_6 es R o D

<SEQ ID NO: 54; PRT1; Secuencia Artificial> (HCDR3 consenso) $E G x_7 T V Y$ en la que x_7 es I, T, E o V

<SEQ ID NO: 55; PRT1; Secuencia Artificial> (LC ADN-B12L/R17L)

ES 2 664 128 T3

GATATTGTGATGACTCAGACTCCACTCTCCCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCT
CCATCTCCTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTCGCGGAAAAACCTATTTGAA
TTGGCTCCTGCAGAAGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTTATGCGGTGTCTAAA
CTGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTTCAGGCACAGATTTTACA
CTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCCGAAGATGTTGGGGTTTATTACTGCGTGCAAGGT
ACACATTACCCATTCACGTTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTG
GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT
CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC
AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGGAGAGTGC

<SEQ ID NO: 56; PRT1; Secuencia Artificial> (HC ADN- B12L)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAG
GTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACGACTTCACTAGATACTATATAAACTGGGTGCGAC
AGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTAATCCTGGAAGCGGTAATA
CTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTACCATTACCGCGGACGAATCCACGA
GCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT
GTGCGAGAGAAGGCATCACGGTCTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
CAGCCTCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC

ES 2 664 128 T3

AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA
CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
CCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGT

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti A β N3pGlu humano diseñado mediante ingeniería genética que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que LCDR1 es KSX1X2SLLYSRX3KTYLN (SEQ ID NO: 51), LCDR2 es AVSKLX4S (SEQ ID NO: 52), LCDR3 es VQGTHYPFT (SEQ ID NO: 5) y HCDR1 es GYX5FTX6YYIN (SEQ ID NO: 53), HCDR2 es WINPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 8) y HCDR3 es EGX7TVY (SEQ ID NO: 54), en el que X1 es S o T; X2 es Q o R, X3 es G o S, X4 es D o G, X5 es D o T, X6 es R o D y X7 es I, T, E o V.
2. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética de la reivindicación 1 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Un anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en terapia.
- 15 4. Un anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica, enfermedad de Alzheimer prodrómica, síndrome de Down y angiopatía amiloidea cerebral (AAC) preclínica o clínica, que comprende la administración a un ser humano que lo necesite del anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética de la reivindicación 1.
- 20 5. Un anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica.