

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 475**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2011 PCT/US2011/032269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2011 E 11715837 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2558494**

54 Título: **Proteínas que se unen a beta amiloide**

30 Prioridad:

25.02.2011 US 446624 P

14.08.2010 US 373825 P

15.04.2010 US 324386 P

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

03.10.2018

73 Titular/es:

ABBVIE INC. (50.0%)

1 North Waukegan Road

North Chicago, IL 60064, US y

ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG (50.0%)

72 Inventor/es:

BARGHORN, STEFAN;

HILLEN, HEINZ;

STRIEBINGER, ANDREAS;

GIAISI, SIMONE;

EBERT, ULRICH y

BENATUIL, LORENZO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 684 475 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

Proteínas que se unen a beta amiloide

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a proteínas que se unen a beta amiloide (A β), a ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas, a métodos de producción de dichas proteínas, a composiciones que comprenden dichas proteínas y al uso de dichas proteínas en el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de afecciones tales como amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por una pérdida progresiva de las capacidades cognitivas y por características neuropatológicas particulares que comprenden depósitos de péptido beta amiloide (A β), ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal en diversas regiones del cerebro (Hardy y Selkoe, Science 297: 353, 2002; Mattson, Nature 431:7004, 2004). Los depósitos de amiloide cerebral y las alteraciones cognitivas muy similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer, son también características distintivas del síndrome de Down (trisomía 21), que se produce con una frecuencia de aproximadamente 1 de cada 800 nacimientos.

15 El péptido A β proviene de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante un procesamiento proteolítico. Este procesamiento se efectúa a través de la actividad cooperativa de varias proteasas denominadas α -, β - y γ -secretasa y conduce a una serie de fragmentos específicos de diferente longitud. Los depósitos amiloides consisten en su mayoría en péptidos con una longitud de 40 o 42 aminoácidos (A β 40, A β 42). Esto también incluye, además de variantes humanas, isoformas de la proteína amiloide β (1-42) presentes en organismos distintos de los seres humanos, en particular, otros mamíferos, especialmente las ratas. Esta proteína, que tiende a una polimerización en un entorno acuoso, puede estar presente en formas moleculares muy diferentes. Una simple correlación del depósito de proteína insoluble con la aparición o la progresión de trastornos de demencia tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, ha demostrado ser poco convincente (Terry et al., Ann. Neurol. 30: 572-580, 1991; Dickson et al., Neurobiol. Aging 16: 285-298, 1995). En contraste, la pérdida de sinapsis y de percepción cognitiva parece correlacionarse mejor con formas solubles de A β (1-42) (Lue et al., Ann. J. Pathol 155: 853-862, 1999; McLean et al., Ann. Neurol. 46: 860-866, 1999).

20 Ninguno de los anticuerpos policlonales y monoclonales que se han obtenido en el pasado contra A β (1-42) monomérica han demostrado producir el efecto terapéutico deseado sin causar también efectos secundarios graves en animales y/o seres humanos. Por ejemplo, los resultados de una inmunización pasiva procedentes de estudios preclínicos en ratones APP23 muy viejos que habían recibido un anticuerpo anti-A β (1-42) dirigido al extremo N-terminal, una vez por semana durante 5 meses, indican efectos secundarios terapéuticamente relevantes. En particular, estos ratones mostraban un aumento de la cantidad y la gravedad de las microhemorragias, en comparación con ratones tratados con solución salina (Pfeifer et al., Science 298: 1379, 2002). Un aumento similar de las hemorragias también fue descrito para ratones muy viejos (>24 meses) Tg2576 y PDAPP (Wilcock et al., J Neuroscience 23: 3745-51, 2003; Racke et al., J Neuroscience 25: 629-636, 2005). En ambas cepas, una inyección de anti-A β (1-42) daba lugar a un aumento significativo de las microhemorragias.

25 El documento WO 2004/067561 se refiere a oligómeros globulares ("globulómeros") del péptido A β (1-42) y a un procedimiento para su preparación. El documento WO 2006/094724 se refiere a oligómeros A β (X - 38 .. 43) globulares que no se difunden, en donde X se selecciona a partir del grupo que consiste en los números 1 .. 24. Los documentos WO 2004/067561 y WO 2006/094724 describen además que una proteólisis limitada de los globulómeros produce versiones truncadas de dichos globulómeros, tales como los globulómeros A β (20-42) o A β (12-42). El documento WO 2007/064917 describe la clonación, expresión y aislamiento de formas recombinantes de péptido β amiloide (denominado en lo sucesivo N-Met A β (1-42)) y formas globuloméricas de los mismos. Los datos sugieren la existencia de una vía, independiente de fibrillas de amiloide, de plegamiento de A β y asociación en oligómeros A β que presentan uno o varios epítomos únicos (en lo sucesivo, denominados epítomos de globulómeros). Ya que los epítomos de globulómeros se detectaron en el cerebro de pacientes con EA y ratones transgénicos APP y el globulómero se une específicamente a las neuronas y bloquea LTP, el globulómero representa un conformero de A β patológicamente relevante. Se ha encontrado que un globulómero de A β soluble ejerce sus efectos perjudiciales esencialmente por la interacción con el canal de calcio presináptico de tipo P/Q y que los inhibidores de esta interacción son por tanto útiles para el tratamiento de amiloidosis tales como la enfermedad de Alzheimer (documento WO 2008/104385).

30 Los anticuerpos que se unen selectivamente a tales formas globuloméricas de A β se han descrito en los documentos WO 2007/064972, WO 2007/062852, WO 2008067464, WO 2008/150946 y WO 2008/150949. Por ejemplo, varios anticuerpos monoclonales conocidos a partir de los documentos WO 2007/062852 y WO 2008/150949 reconocen específicamente el globulómero A β (20-42).

35 Existe una tremenda necesidad terapéutica no satisfecha para el desarrollo de agentes biológicos, tales como proteínas que se unen a A β , para prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad sin inducir efectos negativos y

potencialmente letales en el cuerpo humano. Tal necesidad es particularmente evidente de cara al aumento de la longevidad de la población general y, con ese incremento, un aumento asociado del número de pacientes diagnosticados cada año con la enfermedad de Alzheimer o trastornos relacionados. Además, tales proteínas que se unen a A β permitirán un diagnóstico correcto de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que experimenta sus síntomas, un diagnóstico que solo se puede confirmar actualmente tras una autopsia. Adicionalmente, las proteínas que se unen a A β permitirán aclarar las propiedades biológicas de las proteínas y otros factores biológicos responsables de esta enfermedad debilitante.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une al globulómero A β (20-42) que comprende: una primera secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10 y una segunda secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 14. Los anticuerpos de la presente invención representan una nueva familia de proteínas que se unen a A β (o simplemente "proteínas de unión") capaz de unirse al globulómero A β (20-42) soluble como se describe en el presente documento. Se debe tener en cuenta que las proteínas de unión de la presente invención también pueden ser reactivas con (es decir, unirse a) formas de A β distintas de los globulómeros A β descritos en este documento, tales formas de A β pueden estar presentes en el cerebro de un paciente que tiene una amiloidosis, tal como la enfermedad de Alzheimer. Estas formas de A β pueden ser o no oligoméricas o globuloméricas. Las formas de A β a las que se unen las proteínas de unión de la presente invención, incluyen cualquier forma de A β que comprende el epítipo del globulómero con el que el anticuerpo monoclonal murino/de ratón m4D10 es reactivo (en lo sucesivo denominado "m4D10"). m4D10 y sus propiedades se describen en el documento WO 2007/062852. Tales formas de A β se denominan de aquí en adelante "formas de A β elegidas como dianas". Además, la presente invención también proporciona un medio terapéutico con el que inhibir la actividad de dichas formas de A β elegidas como dianas y proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades asociadas con dichas formas de A β elegidas como dianas, particularmente amiloidosis, tales como la enfermedad de Alzheimer.

La presente descripción también proporciona una proteína de unión que comprende: una primera secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a

SEQ ID NO: 2:

EVQLVESGGGLX¹²QPGGSLRLS²⁴CAX²⁴SGFTX²⁹SSYGVHWV⁴⁸RQAPGKGLEWX⁴⁸X⁴⁹VI
WRGGRIDYNAAFMSRX⁶⁷TISX⁷¹DNSKX⁷⁶TX⁷⁸YLQMNSLRAEDTAVYYCARNSDVW
GQGTTVTVSS,

en la que X¹² es I o V, X²⁴ es A o V, X²⁹ es V o L, X⁴⁸ es V o L, X⁴⁹ es S o G, X⁶⁷ es F o L, X⁷¹ es R o K, X⁷⁶ es N o S y X⁷⁸ es L o V; o

SEQ ID NO: 3:

X¹VQLQESGPGLVK²⁷PSETLSLTCTVSGX²⁷SX²⁹SSYGVHWX³⁷RQPPGKGLEWX⁴⁸GVI
WRGGRIDYNAAFMSRX⁶⁷TISX⁷¹DTSKX⁷⁶QX⁷⁸SLKLSSVTAADTAVYYCARNSDVW
GQGTTVTVSS,

en la que X¹ es Q o E, X²⁷ es G o F, X²⁹ es I o L, X³⁷ es I o V, X⁴⁸ es I o L, X⁶⁷ es V o L, X⁷¹ es V o K, X⁷⁶ es N o S y X⁷⁸ es F o V;

y una segunda secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a

SEQ ID NO: 1:

DVVM⁷TQX⁷PLSLPVTX¹⁵GQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLNWX⁴¹X⁴²QX⁴⁴PGQSPX⁵⁰R
LIYLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC⁵⁰WQGTHFPYTFGQGTK
LEIKR,

en la que X⁷ es S o T, X¹⁵ es L o P, X⁴¹ es F o L, X⁴² es Q o L, X⁴⁴ es R o K y X⁵⁰ es R o Q.

La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una primera secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. Específicamente, la proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una primera secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.

5 La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una segunda secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16. Específicamente, la proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una segunda secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.

10 La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una primera secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11; y una segunda secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16. Específicamente, la proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una primera secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11; y una segunda secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.

20 La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una primera secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6; y una segunda secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14. En un aspecto particular de la invención, el anticuerpo anti-globulímero A β (20-42) comprende una primera secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6; y una segunda secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14.

25 La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una primera secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10; y una segunda secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14. En un aspecto particular adicional de la invención, el anticuerpo anti-globulímero A β (20-42) comprende una primera secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10; y una segunda secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14.

El anticuerpo de la invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (mab), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de doble especificidad, una molécula de unión de dominio variable doble (DVD), un Fab' o un anticuerpo biespecífico.

35 Cuando la proteína de unión descrita en el presente documento es un anticuerpo, comprende al menos una cadena pesada variable que corresponde a la primera secuencia de aminoácidos como se ha definido anteriormente y al menos una cadena ligera variable que corresponde a la segunda secuencia de aminoácidos como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención comprende (i) al menos una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y (ii) al menos una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16. En particular, el anticuerpo descrito en este documento puede comprender (i) al menos una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10 y (ii) al menos una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14.

La proteína de unión descrita en el presente documento puede comprender adicionalmente (además de la primera y la segunda secuencia de aminoácidos) otro resto que puede ser otra secuencia de aminoácidos u otro resto químico. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención puede comprender un dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina seleccionada a partir del grupo que consiste en un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgE humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana y un dominio constante de IgA humana. En otro aspecto, el anticuerpo de la invención comprende una región constante de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, adicionalmente una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. En un aspecto particular de la invención, el anticuerpo

comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10; una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14; una región constante de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25; y una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 27.

5 En un aspecto particular adicional de la invención, el anticuerpo comprende una primera secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47 y una segunda secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48.

La proteína de unión descrita en el presente documento, por ejemplo, el anticuerpo de la invención, puede comprender además un agente terapéutico, un agente de formación de imágenes, residuos capaces de facilitar la formación de una molécula de inmuno adhesión y/u otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). El agente de formación de imágenes puede ser un radiomarcador que incluye, pero no se limita a, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm ; una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético o biotina.

La proteína de unión de la presente invención puede estar glicosilada. De acuerdo con un aspecto de la invención, el patrón de glicosilación es un patrón de glicosilación humano.

En un aspecto de la invención, la proteína de unión descrita anteriormente se une a una forma de A β que comprende el epítipo de globulímero con el que el anticuerpo monoclonal murino m4D10 es reactivo (es decir, una forma de A β seleccionada como diana). En particular las proteínas de unión descritas anteriormente se unen al globulímero beta amiloide (20-42) como se describe en el presente documento.

En un aspecto de la invención, la proteína de unión descrita en el presente documento es capaz de modular una función biológica del globulímero A β (20-42). En un aspecto adicional de la invención, la proteína de unión descrita en el presente documento es capaz de neutralizar la actividad del globulímero A β (20-42).

La proteína de unión de la presente invención puede existir como un cristal. En un aspecto, el cristal es un cristal liberado de forma controlada farmacéutica, sin vehículo. En otro aspecto, la proteína de unión cristalizada tiene una mayor semivida *in vivo* que su homóloga soluble. En todavía otro aspecto, la proteína de unión cristalizada conserva la actividad biológica después de la cristalización.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención. Una realización adicional proporciona un vector que comprende dicho ácido nucleico. Dicho vector se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en pcDNA, pTT (Durocher et al., Nucleic Acids Research 30(2), 2002), pTT3 (pTT con un sitio de clonación múltiple adicional), pEFBOS (Mizushima y Nagata, Nucleic Acids Research 18(17), 1990), pBV pJV y pBJ.

En otro aspecto de la invención, una célula hospedadora se transforma con el vector descrito anteriormente. De acuerdo con una realización, la célula hospedadora es una célula procariota, que incluye pero no se limita a *E. coli*. En una realización relacionada, la célula hospedadora es una célula eucariota seleccionada a partir del grupo que comprende una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica. La célula animal se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula aviar y una célula de insecto. Según un aspecto de la invención, dicha célula de mamífero se selecciona a partir del grupo que comprende CHO y COS, dicha célula fúngica es una célula de levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae* y dicha célula de insecto es una célula Sf9 de insecto.

Además, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención que comprende el cultivo de una cualquiera de las células hospedadoras descritas en este documento en un medio de cultivo, en condiciones y durante un tiempo adecuado para producir dicha proteína de unión. Otra realización proporciona un anticuerpo de la invención producido de acuerdo con el método descrito en el presente documento. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo producido de acuerdo con el método descrito anteriormente.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La descripción también proporciona una composición para la liberación de la proteína de unión descrita en el presente documento, en donde la composición comprende una formulación que comprende a su vez una proteína de unión cristalizada, por ejemplo, un anticuerpo cristalizado, como se ha descrito anteriormente y un ingrediente; y al menos un vehículo polimérico. En un aspecto, el vehículo polimérico es un polímero seleccionado a partir de uno o varios del grupo que consiste en: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptidos), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(β -hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil) metacrilamida), poli((organo)fosfaceno), poli(orto-ésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico - éter alquil vinílico, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos. En otro aspecto, el ingrediente se selecciona a partir del grupo que consiste en: albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

La presente descripción también se refiere a un método de inhibición (es decir, reducción) de la actividad del glóbulo 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

La descripción también proporciona un método para inhibir (es decir, reducir) la actividad de una forma de A β seleccionada como diana en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno, en donde la actividad de dicha forma de A β es perjudicial. Dicho método puede comprender administrar al sujeto al menos una de las proteínas de unión descritas en este documento, de tal manera que se inhibe la actividad de una forma de A β seleccionada como diana en el sujeto (es decir, se reduce). Por lo tanto, las proteínas que se unen a A β descritas en este documento se pueden usar en la inhibición (es decir, reducción) de una forma de A β seleccionada como diana en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno como se describe en el presente documento, en donde al menos una de las proteínas de unión descritas en este documento se administra al sujeto, de tal manera que se inhibe la actividad de dicha forma de A β en el sujeto (es decir, se reduce).

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para uso en un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, mejorar, retrasar o prevenir la aparición de, o prevenir la recurrencia o la recaída de) o prevenir una enfermedad o un trastorno seleccionado a partir del grupo que consiste en amiloidosis AL sistémica, amiloidosis AL nodular, amiloidosis AA sistémica, amiloidosis prostática, amiloidosis por hemodiálisis, amiloidosis visceral familiar, amiloidosis sistémica senil, amiloidosis cardíaca familiar, enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. En una realización particular, dicha enfermedad o trastorno es una amiloidosis, tal como la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down. Dicho método comprende la etapa de administrar uno cualquiera de los anticuerpos que se unen a A β de la invención de tal manera que se consigue un tratamiento. En otra realización, el método comprende la etapa de administrar uno cualquiera de los anticuerpos que se unen a A β de la invención, simultáneamente con o después de la administración de uno o varios agentes terapéuticos adicionales. Por lo tanto, la invención proporciona las proteínas que se unen a A β descritas en este documento para uso en el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno descrito en la presente memoria, que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las proteínas de unión descritas en esta memoria, de forma simultánea con o después de la administración de uno o varios agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, el agente terapéutico adicional se selecciona a partir del grupo de agentes terapéuticos enumerados en este documento.

Las proteínas de unión descritas en este documento y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de unión se administran a un sujeto a través de al menos un modo seleccionado para la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebral, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, en embolada, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmica.

La presente descripción también proporciona un método para detectar una forma de A β seleccionada como diana en una muestra que comprende (i) poner en contacto dicha muestra con proteína(s) de unión de la invención y (ii) detectar la formación de un complejo entre dicha o dichas proteínas de unión y elementos de dicha muestra, en donde la formación o el aumento de formación del complejo en la muestra, en relación con una muestra de control, indica la presencia de dicha forma de A β en la muestra. La muestra puede ser una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad o un trastorno como se describe en el presente documento (por ejemplo, sangre completa, fluido cerebroespinal, suero, tejido, etc.) o un cultivo celular que contiene o que se sospecha que contiene dicha forma de A β . La muestra de control no contiene dicha forma de A β o se obtiene a partir de un paciente que no tiene una enfermedad como se ha descrito anteriormente. La presencia de un complejo entre dicha o dichas proteínas de unión y elementos de una muestra obtenida a partir de un paciente sospechoso de tener la enfermedad de Alzheimer, indica un diagnóstico de esta enfermedad en dicho paciente.

Alternativamente, la detección de la forma de A β seleccionada como diana puede realizarse *in vivo*, por ejemplo, mediante la formación de imágenes *in vivo* en un sujeto. Para este fin, la o las proteínas de unión de la invención se pueden administrar a un sujeto o a un sujeto de control en condiciones que permiten la unión de dicha o dichas proteínas a la forma de A β seleccionada como diana y detectar la formación de un complejo entre dicha o dichas proteínas de unión y dicha forma de A β , en donde la formación o una formación incrementada del complejo en el sujeto con respecto al sujeto de control, indica la presencia de dicha forma de A β en el sujeto. El sujeto puede ser un sujeto que se sabe o que se sospecha que padece un trastorno o una enfermedad en la que la actividad de una forma de

A β seleccionada como diana es perjudicial.

Breve descripción de las Figuras

- 5 La Figura 1 ilustra secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de la cadena ligera variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprenden las regiones estructurales Jk2 y Vk A17/2-30. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- La Figura 2 ilustra secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprenden las regiones estructurales JH6 humana (hJH6) y VH3_53. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 10 La Figura 3 ilustra secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprenden las regiones estructurales JH6 humana y VH4_59. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- La Figura 4 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana (hJH6) y VH3_53. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 15 La Figura 5 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH3_53 con el cambio de consenso de VH3, I12V. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- La Figura 6 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH3_53 con el cambio de consenso de VH3, I12V y las retromutaciones estructurales A24V, V29L, V48L, S49G, F67L, R71K, N76S y L78V. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 20 La Figura 7 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH3_53 con las retromutaciones estructurales V29L y R71K. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 25 La Figura 8 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH4_59. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- La Figura 9 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH4_59 con un cambio Q1E para prevenir la formación de piroglutamato N-terminal. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 30 La Figura 10 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH4_59 con un cambio Q1E para prevenir la formación de piroglutamato N-terminal y las retromutaciones estructurales G27F, I29L, I37V, I48L, V67L, V71K, N76S y F78V. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 35 La Figura 11 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de la cadena pesada variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH4_59 con un cambio Q1E para prevenir la formación de piroglutamato N-terminal y las retromutaciones estructurales G27F, I29L y V71K. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- La Figura 12 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de la cadena ligera variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales Jk2 y Vk A17/2-30. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 40 La Figura 13 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de la cadena ligera variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales Jk2 y Vk A17/2-30 con los cambios de consenso de Vk2, S7T, L15P, Q37L, R39K y R45Q. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 45 La Figura 14 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de la cadena ligera variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales Jk2 y Vk A17/2-30 con cambios de consenso de Vk2, S7T, L15P, Q37L, R39K y R45Q y la retromutación estructural F36L. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- La Figura 15 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de la cadena ligera variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales Jk2 y Vk A17/2-30 con los cambios de consenso de Vk2, S7T y Q37L. Todas las regiones CDRs están subrayadas.
- 50 La Figura 16 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de la cadena ligera variable de anticuerpos humanizados 4D10 que comprende las regiones estructurales Jk2 y Vk A17/2-30 con los cambios de consenso de Vk2,

S7T, Q37L y R39K. Todas las regiones CDRs están subrayadas.

La Figura 17 ilustra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas variables del anticuerpo monoclonal murino 4D10 (m4D19) y anticuerpos humanizados 4D10 (4D10hum) que comprenden las regiones estructurales JH6 humana (hJH6) y VH3_53. Todas las regiones CDRs están impresas en negrita. X en la posición 12 es I o V, X en la posición 24 es A o V, X en la posición 29 es V o L, X en la posición 48 es V o L, X en la posición 49 es S o G, X en la posición 67 es F o L, X en la posición 71 es R o K, X en la posición 76 es N o S y X en la posición 78 es L o V.

La Figura 18 ilustra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas variables del anticuerpo monoclonal murino 4D10 (m4D19) y anticuerpos humanizados 4D10 (4D10hum) que comprenden las regiones estructurales JH6 humana y VH4_59. Todas las regiones CDRs están impresas en negrita. X en la posición 1 es Q o E, X en la posición 27 es G o F, X en la posición 29 es I o L, X en la posición 37 es I o V, X en la posición 48 es I o L, X en la posición 67 es V o L, X en la posición 71 es V o K, X en la posición 76 es N o S y X en la posición 78 es F o V.

La Figura 19 ilustra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras variables del anticuerpo monoclonal murino 4D10 (m4D19) y anticuerpos humanizados 4D10 (4D10hum) que comprenden las regiones estructurales Jk2 y Vk A17/2-30. Todas las regiones CDRs están impresas en negrita. X en la posición 7 es S o T, X en la posición 15 es L o P, X en la posición 41 es F o L, X en la posición 42 es Q o L, X en la posición 44 es R o K y X en la posición 50 es R o Q.

Las Figuras 20A y B muestran la reacción cruzada con el factor plaquetario 4 (PF-4) de anticuerpos monoclonales humanizados 4D10hum#1 y 4D10hum#2, el anticuerpo quimérico humano/ratón h1G5 (control positivo) y el anticuerpo policlonal humano h1G1 (control negativo) en (A) plasma de macaco cangrejero y (B) plasma humano, como se determina por ELISA de tipo sándwich. Se detecta la unión de PF-4 a los anticuerpos inmovilizados.

Las Figuras 21A y B muestran la reacción cruzada con el factor plaquetario 4 (PF-4) de anticuerpos monoclonales humanizados 4D10hum#1 y 4D10hum#2, el anticuerpo quimérico humano/ratón h1G5 (control positivo) y el anticuerpo policlonal humano h1G1 (control negativo) en (A) plasma de macaco cangrejero y (B) plasma humano, como se determina por ELISA de tipo sándwich alineado. Los anticuerpos se capturaron sobre la placa mediante IgG anti-ratón inmovilizada. Se detectó la unión de PF-4 a los anticuerpos capturados.

Las Figuras 22A y B muestran la reacción cruzada con el factor plaquetario 4 (PF-4) de anticuerpos monoclonales murinos m4D10 y el anticuerpo m1G5 anti-PF-4 humano (control positivo) e IgG2a (control negativo) en (A) plasma de macaco cangrejero y (B) plasma humano, como se determina por ELISA de tipo sándwich. Se detectó la unión de PF-4 a los anticuerpos inmovilizados.

Las Figuras 23A y B muestran la reacción cruzada con el factor plaquetario 4 (PF-4) de anticuerpos monoclonales murinos m4D10 y el anticuerpo m1G5 anti-PF-4 humano (control positivo) e IgG2a (control negativo) en (A) plasma de macaco cangrejero y (B) plasma humano, como se determina por ELISA de tipo sándwich alineado. Los anticuerpos se capturaron sobre la placa mediante IgG anti-ratón inmovilizada. Se detectó la unión de PF-4 a los anticuerpos capturados.

La Figura 24 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 46) de la cadena pesada de un anticuerpo humanizado 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH3_53 con el cambio de consenso de VH3, I12V y las retromutaciones estructurales A24V, V29L, V48L, S49G, F67L, R71K, N76S y L78V; y una región constante gamma-1 de Ig. Todas las regiones CDRs están subrayadas.

La Figura 25 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 47) de la cadena pesada de un anticuerpo humanizado 4D10 que comprende las regiones estructurales JH6 humana y VH4_59 con un cambio Q1E para prevenir la formación de piroglutamato N-terminal y las retromutaciones estructurales G27F, I29L, I37V, I48L, V67L, V71K, N76S y F78V; y una región constante gamma-1 de Ig. Todas las regiones CDRs están subrayadas.

La Figura 26 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 48) de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado 4D10 que comprende las regiones estructurales Jk2 y Vk A17/2-30 con los cambios de consenso de Vk2, S7T, L15P, Q37L, R39K y R45Q y la retromutación estructural F36L; y una región constante kappa de Ig. Todas las regiones CDRs están subrayadas.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos normales en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben estar claros, sin embargo, en caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento tienen prioridad sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán plurales y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso de la expresión "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Además, términos tales como "elemento" o "componente" incluyen ambos elementos y

componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique de otro modo.

5 Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación, descritas en este documento, son aquellas bien conocidas y que se emplean comúnmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas en relación con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y suministro farmacéutico y tratamiento de pacientes.

15 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-A β que se unen al globulímero A β (20-42). Estos anticuerpos que se unen a A β son capaces de discriminar no solo otras formas de péptidos A β , en particular monómeros y fibrillas, sino también formas no truncadas de globulímeros A β . Por lo tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a A β que tiene afinidad de unión a un globulímero A β (20-42) que es mayor que la afinidad de unión de esta proteína que se une a A β hacia un globulímero A β (1-42).

20 El término "A β (X-Y)" tal y como se emplea en este documento, se refiere a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido X hasta la posición del aminoácido Y de la proteína beta amiloide (A β) humana incluyendo tanto X como Y, en particular a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido X hasta la posición del aminoácido Y de la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IGLMVGGVV IAT (SEQ ID NO:29) (que se corresponde a las posiciones de aminoácidos 1 a 43) o cualquiera de sus variantes naturales, en particular aquellas con al menos una mutación seleccionada a partir del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, en donde los números se refieren al inicio del péptido A β , incluyendo tanto la posición X como la posición Y, o a una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, en donde ninguna de las cuales puede evitar la formación del globulímero. Según un aspecto, no hay sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción desde el aminoácido 12 o X, o cualquier cifra superior, hasta el aminoácido 42 o Y, o cualquier cifra inferior. Según otro aspecto, no hay sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción desde el aminoácido 20 o X, o cualquier cifra superior, hasta el aminoácido 42 o Y, o cualquier cifra inferior. Según otro aspecto, no hay sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción desde el aminoácido 20 o X, o cualquier cifra superior, hasta el aminoácido 40 o Y, o cualquier cifra superior inferior. Una sustitución de aminoácidos "adicional" en este documento es cualquier desviación de la secuencia canónica que no se encuentra en la naturaleza.

Más específicamente, el término "A β (1-42)" tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido 1 a la posición del aminoácido 42 de la proteína A β humana, incluyendo tanto 1 como 42, en particular a la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IGLMVGGVV IA (SEQ ID NO: 30) o cualquiera de sus variantes que se producen de forma natural, en particular aquellas con al menos una mutación seleccionada a partir del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, en donde los números se refieren al inicio del péptido A β , incluyendo tanto 1 como 42 o a una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, en donde ninguna de las cuales puede evitar la formación del globulímero. Según un aspecto, no hay sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción desde el aminoácido 20 al aminoácido 42. Del mismo modo, el término "A β (1-40)", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácidos 1 hasta la posición del aminoácido 40 de la proteína A β humana que incluye tanto 1 como 40, en particular la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IGLMVGGVV (SEQ ID NO:31) o cualquiera de sus variantes naturales, en particular aquellas con al menos una mutación seleccionada a partir del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian") y D23N ("Iowa"), en donde los números se refieren al inicio del péptido A β , incluyendo tanto 1 como 40, o a una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, en donde ninguna de las cuales puede evitar la formación del globulímero. De acuerdo con un aspecto, no hay sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción desde el aminoácido 20 hasta el aminoácido 40.

Más específicamente, el término "A β (12-42)" tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido 12 a la posición del aminoácido 42 de la proteína A β humana, incluyendo tanto 12 como 42, en particular a la secuencia de aminoácidos VHHQKLVFF AEDVGSNKGA IGLMVGGVV IA (SEQ ID NO: 32) o cualquiera de sus variantes que se producen de forma natural, en particular aquellas con al menos una mutación seleccionada a partir del grupo que consiste en A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, en donde los números se refieren al inicio del péptido A β , incluyendo tanto 12 como 42, o a una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, en donde ninguna de las cuales puede evitar la formación del globulímero. Según un aspecto, no hay sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción desde el aminoácido 20 al aminoácido 42. Del mismo modo, el

término "A β (20-42)", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido 20 hasta la posición del aminoácido 42 de la proteína β amiloide humana que incluye tanto 20 como 42, en particular la secuencia de aminoácidos F AEDVGSNKGK IIGLMVGGVV IA (SEQ ID NO:33) o cualquiera de sus variantes naturales, en particular aquellas con al menos una mutación seleccionada a partir del grupo que consiste en A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, en donde los números se refieren al inicio del péptido A β , incluyendo tanto 20 como 42, o a una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, en donde ninguna de las cuales puede evitar la formación del globulómero. De acuerdo con un aspecto, hay cualquier sustitución de aminoácidos adicional.

El término "globulómero A β (X-Y)" (oligómero globular A β (X-Y)) tal y como se utiliza en este documento, se refiere a una asociación soluble, globular, no covalente de péptidos A β (X-Y), como se han definido anteriormente, que posee homogeneidad y distintas características físicas. Según un aspecto, los globulómeros A β (X-Y) son conjuntos oligoméricos estables, no fibrilares, de péptidos A β (X-Y) que pueden obtenerse mediante la incubación con detergentes aniónicos. En contraste con los monómeros y las fibrillas, estos globulómeros se caracterizan por los números de asociaciones definidas de subunidades (por ejemplo, formas de asociación tempranas con 4-6 subunidades, "oligómeros A"; y formas de asociación tardías con 12-14 subunidades, "oligómeros B"; como se describen en el documento WO2004/067561). Los globulómeros tienen una estructura de tipo globular tridimensional ("glóbulo fundido", véase Barghom et al., J Neurochem 95: 834-847, 2005). Pueden caracterizarse adicionalmente por una o varias de las siguientes características:

- escisión de los aminoácidos X-23 N-terminales con proteasas promiscuas (tales como termolisina o endoproteinasa GluC) produciendo formas truncadas de globulómeros;
- falta de accesibilidad de los aminoácidos 24-Y C-terminales con proteasas promiscuas y anticuerpos;
- formas truncadas de estos globulómeros conservan la estructura del núcleo tridimensional de dichos globulómeros con una mejor accesibilidad del epítipo del núcleo A β (20-Y) en su conformación de globulómero.

De acuerdo con la invención y en particular con el fin de evaluar las afinidades de unión de las proteínas que se unen a A β de la presente invención, la expresión "globulómero A β (X-Y)" en este documento se refiere en particular a un producto que es obtenible mediante un procedimiento como el que se describe en el documento WO2004/067561. Dicho procedimiento comprende desplegar un péptido A β (X-Y) natural, recombinante o sintético o un derivado del mismo;

exponer el péptido A β (X-Y) al menos parcialmente desplegado o un derivado del mismo a un detergente, reducir la acción del detergente y continuar con la incubación.

Con el fin de desplegar el péptido, se puede permitir que agentes que rompen los enlaces de hidrógeno tales como, por ejemplo, hexafluoroisopropanol (HFIP), actúen sobre la proteína. Tiempos de acción de unos pocos minutos, por ejemplo, de aproximadamente 10 a 60 minutos, son suficientes cuando la temperatura de acción es desde aproximadamente 20 a 50°C y, en particular de aproximadamente 35 a 40°C. Una posterior disolución del residuo evaporado hasta sequedad, por ejemplo, en forma concentrada, en disolventes orgánicos adecuados, miscibles con tampones acuosos, tales como, por ejemplo, sulfóxido de dimetilo (DMSO), da como resultado una suspensión del péptido al menos parcialmente desplegado o un derivado del mismo, que se puede utilizar posteriormente. Si es necesario, la suspensión de reserva se puede almacenar a baja temperatura, por ejemplo, a aproximadamente 20°C, durante un período transitorio. Alternativamente, el péptido o un derivado del mismo se puede tomar en una solución acuosa ligeramente ácida, por ejemplo, una solución acuosa de HCl aproximadamente 10 mM. Después de un tiempo de incubación de normalmente unos pocos minutos, los componentes insolubles se eliminan por centrifugación. Unos pocos minutos a 10000 g es conveniente. Estas etapas del método se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente, es decir, una temperatura en el intervalo de 20 a 30°C. El material sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene el péptido A β (X-Y) o el derivado del mismo y se puede almacenar a baja temperatura, por ejemplo, a aproximadamente -20°C, durante un período transitorio. La siguiente exposición a un detergente se refiere a la oligomerización del péptido o el derivado del mismo para proporcionar un tipo intermedio de oligómeros (en el documento WO 2004/067561 se refiere a oligómeros A). Para este fin, se permite que un detergente actúe sobre el péptido al menos parcialmente desplegado o un derivado del mismo hasta que se produce suficiente oligómero intermedio. Se da preferencia a la utilización de detergentes iónicos, en particular detergentes aniónicos.

De acuerdo con una realización particular, se emplea un detergente de fórmula (I):



en donde el radical R es alquilo no ramificado o ramificado que tiene de 6 a 20, por ejemplo 10 a 14, átomos de carbono o alqueno no ramificado o ramificado que tiene de 6 a 20, por ejemplo 10 a 14, átomos de carbono, el radical X es un grupo ácido o una sal del mismo, en donde X se selecciona, por ejemplo, a partir de -COO-M⁺, -SO₃-M⁺ y especialmente -OSO₃-M⁺ y M⁺ es un catión de hidrógeno o un catión inorgánico u orgánico seleccionado a partir de, por ejemplo, cationes de metal alcalino y de metal alcalinotérreo y cationes de amonio. Ventajosamente son detergentes de la fórmula (I), en la que R es alquilo no ramificado, de los cuales se deben mencionar en particu-

lar los radicales alqu-1-ilo. Por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS), ácido láurico, la sal sódica del detergente lauroilsarcosina (también conocida como sarcosil NL-30 o Gardol[®]) y ácido oleico se pueden utilizar ventajosamente. El tiempo de acción del detergente depende, en particular, de si (y en caso afirmativo, en qué medida) el péptido o el derivado del mismo sometido a una oligomerización, se ha desplegado. Si, de acuerdo con la etapa de despliegue, el péptido o el derivado del mismo se ha tratado previamente con un agente que rompe los enlaces de hidrógeno, es decir, en particular con hexafluoroisopropanol, los tiempos de acción en el intervalo de unas pocas horas, ventajosamente de aproximadamente 1 a 20 y en particular de aproximadamente 2 a 10 horas, son suficientes cuando la temperatura de acción es de aproximadamente 20 a 50°C y en particular de aproximadamente 35 a 40°C. Si un péptido menos desplegado o esencialmente no desplegado o un derivado del mismo es el punto de partida, de manera correspondiente son convenientes tiempos de acción más largos. Si el péptido o el derivado del mismo se ha tratado previamente, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento indicado anteriormente como una alternativa al tratamiento con HFIP, o dicho péptido o un derivado del mismo se somete directamente a una oligomerización, los tiempos de acción en el intervalo desde aproximadamente 5 a 30 horas y en particular desde aproximadamente 10 a 20 horas, son suficientes cuando la temperatura de acción es de aproximadamente 20 a 50°C y, en particular de aproximadamente 35 a 40°C. Después de la incubación, los componentes insolubles se eliminan ventajosamente mediante centrifugación. Unos pocos minutos a 10000 g es conveniente. La concentración de detergente que se va a elegir depende del detergente utilizado. Si se usa SDS, una concentración en el intervalo de 0,01 a 1% en peso, por ejemplo, de 0,05 a 0,5% en peso, por ejemplo de aproximadamente 0,2% en peso, es conveniente. Si se utiliza ácido láurico o ácido oleico, concentraciones algo mayores son convenientes, por ejemplo, en un intervalo de 0,05 a 2% en peso, por ejemplo, de 0,1 a 0,5% en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,5% en peso. La acción del detergente debe tener lugar a una concentración de sal que esté aproximadamente en el intervalo fisiológico. Por lo tanto, en particular, las concentraciones de NaCl en el intervalo de 50 a 500 mM, por ejemplo, de 100 a 200 mM o aproximadamente de 140 mM, son convenientes. La reducción subsiguiente de la acción del detergente y la continuación de la incubación se refiere a una oligomerización adicional para proporcionar el globulómero A β (X-Y) (en el documento WO2004/067561 se hace referencia a oligómeros B). Puesto que la composición obtenida a partir de la etapa anterior contiene regularmente detergente y una concentración de sal en el intervalo fisiológico, entonces es conveniente reducir la acción del detergente y también la concentración de sal. Esto se puede llevar a cabo mediante una reducción de la concentración de detergente y de sal, por ejemplo, mediante una dilución, convenientemente con agua o un tampón de menor concentración salina, por ejemplo Tris-HCl, pH 7,3. Los factores de dilución en el intervalo de aproximadamente 2 a 10, ventajosamente en el intervalo de aproximadamente 3 a 8 y, en particular, de aproximadamente 4, han demostrado ser adecuados. La reducción de la acción del detergente también se puede lograr mediante la adición de sustancias que pueden neutralizar dicha acción del detergente. Ejemplos de las mismas incluyen sustancias capaces de formar complejos con los detergentes, como sustancias capaces de estabilizar las células en el curso de medidas de purificación y extracción, por ejemplo en particular, copolímeros de bloque EO/PO, en particular, el copolímero de bloque con el nombre comercial Pluronic[®] F 68. Los alquilfenoles alcoxilados y, en particular, los alquil fenoles etoxilados tales como los t-octilfenoles etoxilados de la serie Triton[®] X, en particular, Triton[®] X100, 3-(3-colamidopropildimetilamonio)-1-propanosulfonato (CHAPS[®]) o alcoxilados y, en particular, ésteres grasos de sorbitán etoxilados, tales como los de la serie Tween[®], en particular Tween[®] 20, en intervalos de concentración de aproximadamente o superiores a la concentración micelar crítica en particular, se pueden utilizar igualmente. Posteriormente, se incuba la solución hasta que se produce suficiente globulómero A β (X-Y). Los tiempos de acción en el intervalo de varias horas, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 10 a 30 horas o en el intervalo de aproximadamente 15 a 25 horas, son suficientes cuando la temperatura de acción es de aproximadamente 20 a 50°C y, en particular de aproximadamente 35 a 40°C. La solución se puede concentrar después y posibles residuos se pueden eliminar mediante centrifugación. También en ese caso, unos pocos minutos a 10.000 g se considera útil. El material sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene un globulómero A β (X-Y). Un globulómero A β (X-Y) se puede recuperar finalmente de una manera conocida per se, por ejemplo, mediante ultrafiltración, diálisis, precipitación o centrifugación. Por ejemplo, una separación electroforética de los globulómeros A β (X-Y) en condiciones de desnaturalización, por ejemplo, con SDS-PAGE, puede producir una doble banda (por ejemplo, con un peso molecular aparente de 38/48 kDa para A β (1-42)) y después del tratamiento con glutaraldehído de los globulómeros antes de la separación, estas dos bandas se pueden fusionar en una sola. La cromatografía de exclusión por tamaño de los globulómeros puede dar lugar a un único pico (por ejemplo, el correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 100 kDa para el globulómero A β (1-42) o de aproximadamente 60 kDa para el globulómero A β (1-42) reticulado con glutaraldehído), respectivamente. Partiendo del péptido A β (1-42), el péptido A β (12-42) y el péptido A β (20-42), dichos procedimientos son adecuados en particular para la obtención de globulómeros A β (1-42), globulómeros A β (12-42) y globulómeros A β (20-42).

Los globulómeros A β (X-Y) en donde X se selecciona a partir del grupo que consiste en los números 2 .. 24 e Y es como se ha definido anteriormente, se pueden obtener mediante el truncamiento de globulómeros A β (1-Y) en formas más cortas, en donde X se selecciona entre el grupo que consiste en los números 2 .. 24, por ejemplo, siendo X 20 o 12, e Y como se ha definido anteriormente, lo que se puede conseguir mediante un tratamiento con proteasas apropiadas. Por ejemplo, un globulómero A β (20-42) se puede obtener sometiendo un globulómero A β (1-42) a proteólisis con termolisina y un globulómero A β (12-42) se puede obtener sometiendo un globulómero A β (1-42) a proteólisis con endoproteinasa GluC. Cuando se alcanza el grado deseado de proteólisis, la proteasa se inactiva de una manera generalmente conocida. Los globulómeros resultantes se pueden aislar después, siguiendo los procedimientos ya descritos en el presente documento y, si se requiere, se procesan posteriormente mediante otras etapas de tratamiento y purificación. Una descripción detallada de dichos procedimientos se describe en el documento

WO2004/067561.

Para los fines de la presente invención, un globulómero A β (1-42) es, en particular, el globulómero A β (1-42) como se describe en el Ejemplo 1a a continuación; un globulómero A β (20-42) es, en particular, el globulómero A β (20-42) como se describe en el Ejemplo 1b a continuación y un globulómero A β (12-42) es, en particular, el globulómero A β (12-42) como se describe en el Ejemplo 1c a continuación. De acuerdo con un aspecto de la invención, el globulómero muestra afinidad hacia las células neuronales y/o muestra efectos neuromoduladores.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el globulómero consiste en 11 a 16, por ejemplo, de 12 a 14 péptidos A β (X-Y). De acuerdo con otro aspecto de la invención, la expresión "globulómero A β (X-Y)" en el presente documento se refiere a un globulómero que consiste esencialmente en subunidades de A β (X-Y), en donde, por ejemplo, como promedio, al menos 11 de 12 subunidades son del tipo A β (X-Y), o menos del 10% de los globulómeros comprende algún péptido que no es A β (X-Y) o el contenido en péptidos que no son A β (X-Y) está por debajo del umbral de detección. Más específicamente, la expresión "globulómero A β (1-42)" en el presente documento se refiere a un globulómero que consiste esencialmente en unidades de A β (1-42) como se han definido anteriormente; la expresión "globulómero A β (12-42)" en el presente documento se refiere a un globulómero que consiste esencialmente en unidades de A β (12-42) como se han definido anteriormente; y la expresión "globulómero A β (20-42)" en el presente documento se refiere a un globulómero que consiste esencialmente en unidades de A β (20-42) como se ha definido anteriormente.

La expresión "globulómero A β (X-Y) reticulado" en este documento, se refiere a una molécula que se puede obtener a partir de un globulómero A β (X-Y) como se ha descrito anteriormente, mediante reticulación, por ejemplo, mediante reticulación química, reticulación con aldehído, reticulación con glutaraldehído, de las unidades constituyentes del globulómero. En otro aspecto de la invención, un globulómero reticulado es esencialmente un globulómero en el que las unidades están al menos parcialmente unidas por enlaces covalentes, en lugar de estar unidas solo por interacciones no covalentes. Para los fines de la presente invención, un globulómero A β (1-42) reticulado es, en particular, el oligómero A β (1-42) reticulado como se describe en el Ejemplo 1d a continuación.

La expresión "derivado de globulómero A β (X-Y)" en este documento, se refiere en particular, a un globulómero que está marcado por estar unido covalentemente a un grupo que facilita la detección, por ejemplo, un fluoróforo, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, proteína fluorescente de *Aequorea victoria*, proteína fluorescente de *Dictyosoma* o cualquier combinación de derivados de los mismos, activa fluorescentemente; un cromóforo; un quimioluminóforo, por ejemplo, luciferasa, en particular la luciferasa de *Photinus pyralis*, luciferasa de *Vibrio fischeri* o cualquier combinación o derivados de los mismos activos quimioluminiscentemente; un grupo enzimáticamente activo, por ejemplo, peroxidasa, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o cualquier derivado del mismo enzimáticamente activo; un grupo denso en electrones, por ejemplo, un grupo que contiene metales pesados, por ejemplo, un grupo que contiene oro; un hapteno, por ejemplo, un hapteno derivado de fenol; una estructura fuertemente antigénica, por ejemplo, una secuencia de péptido que se prevé que sea antigénica, por ejemplo, que se prevé que sea antigénica por el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar; un aptámero para otra molécula; un grupo quelante, por ejemplo, hexahistidinilo; una estructura de proteína natural o derivada de la naturaleza que media en otras interacciones específicas proteína-proteína, por ejemplo, un miembro de la pareja fos/jun; un grupo magnético, por ejemplo, un grupo ferromagnético; o un grupo radiactivo, por ejemplo, un grupo que comprende ¹H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I o cualquier combinación de los mismos; o a un globulómero marcado por tener una interacción covalente o no covalente de alta afinidad ligada a un grupo que facilita la inactivación, el secuestro, la degradación y/o la precipitación, por ejemplo, marcado con un grupo que favorece la degradación *in vivo*, tal como ubicuitina, en donde este oligómero marcado, por ejemplo, está ensamblado *in vivo*; o a un globulómero modificado por cualquier combinación anterior. Tales grupos marcadores y señaladores y los métodos para fijarlos a proteínas señaladoras, son conocidos en la técnica. Marcar y/o señalar se puede realizar antes, durante o después de la globulomerización. En otro aspecto de la invención, un derivado de globulómero es una molécula que se puede obtener a partir de un globulómero mediante una reacción de marcado y/o señalización. Correspondientemente, la expresión "derivado de un monómero A β (X-Y)" en este documento, se refiere en particular a un monómero A β que está marcado o señalado como se describe para el globulómero.

En un aspecto adicional de la invención, las proteínas de unión descritas en el presente documento se unen al globulómero A β (20-42) con una afinidad elevada, por ejemplo, con una constante de disociación (K_D) de como máximo aproximadamente 10^{-6} M; como máximo aproximadamente 10^{-7} M; como máximo aproximadamente 10^{-8} M; como máximo aproximadamente 10^{-9} M; como máximo aproximadamente 10^{-10} M; como máximo aproximadamente 10^{-11} M; como máximo aproximadamente 10^{-12} M; y lo máximo 10^{-13} M. En un aspecto, la constante de la tasa de asociación (k_{on}) de la proteína de unión descrita en este documento, para el globulómero A β (20-42) se selecciona entre el grupo que consiste en: al menos aproximadamente 10^2 M⁻¹ s⁻¹; al menos aproximadamente 10^3 M⁻¹ s⁻¹; al menos aproximadamente 10^4 M⁻¹ s⁻¹; al menos aproximadamente 10^5 M⁻¹ s⁻¹; y al menos aproximadamente 10^6 M⁻¹ s⁻¹; tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial. En otro aspecto, las proteínas de unión tienen una constante de tasa de disociación (k_{off}) para el globulómero A β (20-42) seleccionada a partir del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente 10^{-3} s⁻¹; como máximo aproximadamente 10^{-4} s⁻¹; como máximo aproximadamente 10^{-5} s⁻¹; y como máximo aproximadamente 10^{-6} s⁻¹, tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial. En un aspecto particular de la invención, las proteínas de unión descritas en este documento se unen al globulómero A β (20-42) con una constante de disociación de 1×10^{-9} a 1×10^{-10} M. En un aspecto particular adicional de la invención, la

constante de la tasa de asociación (k_{on}) de la proteína de unión descrita en este documento para el globulímero A β (20-42) es de 1×10^5 a $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En un aspecto particular adicional de la invención, las proteínas de unión descritas en este documento tienen una constante de tasa de disociación (k_{off}) para el globulímero A β (20-42) de 8×10^5 a $8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$.

- 5 En otro aspecto de la invención, la afinidad de unión de las proteínas de unión descritas en este documento hacia el globulímero A β (20-42) es mayor que hacia un globulímero A β (1-42).

La expresión "mayor afinidad" se refiere en este documento a un grado de interacción en el que el equilibrio entre la proteína que se une a A β no unida y el globulímero A β no unido por una parte, y el complejo proteína que se une a A β -globulímero por otra parte está más a favor del complejo proteína que se une a A β -globulímero. Asimismo, la expresión "menor afinidad" se refiere en este documento a un grado de interacción en el que el equilibrio entre la proteína que se une a A β no unida y el globulímero A β no unido por una parte, y el complejo proteína que se une a A β -globulímero por otra parte está más a favor de la proteína que se une a A β no unida y globulímero A β no unido. La expresión "mayor afinidad" es sinónimo de la expresión "afinidad más alta" y la expresión "menor afinidad" es sinónimo de la expresión "afinidad más baja".

- 15 En un aspecto relacionado de la invención, la afinidad de la unión de las proteínas de unión descritas en este documento hacia el globulímero A β (20-42) es al menos 2 veces (por ejemplo, al menos 3 o al menos 5 veces), al menos 10 veces (por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces), al menos 100 veces (por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces) y al menos 1.000 veces (por ejemplo, al menos 2.000 veces, al menos 3.000 veces o al menos 5000 veces), al menos 10.000 veces (por ejemplo, al menos 20.000 veces, al menos 30.000 veces o al menos 50.000 veces) o al menos 100.000 veces mayor que la afinidad de la unión de la proteína de unión hacia el globulímero A β (1-42).

En todavía un aspecto adicional de la invención, las proteínas de unión descritas en el presente documento se unen al globulímero A β (12-42) con una afinidad relativamente alta, por ejemplo, con una constante de disociación (K_D) de como máximo aproximadamente 10^{-6} M ; como máximo aproximadamente 10^{-7} M ; como máximo aproximadamente 10^{-8} M ; como máximo aproximadamente 10^{-9} M ; como máximo aproximadamente 10^{-10} M ; como máximo aproximadamente 10^{-11} M ; como máximo aproximadamente 10^{-12} M ; y como máximo 10^{-13} M . En un aspecto, la constante de tasa de asociación (k_{on}) de la proteína de unión descrita en este documento para el globulímero A β (12-42), se selecciona a partir del grupo que consiste en: al menos aproximadamente $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial. En otro aspecto, las proteínas de unión tienen una constante de tasa de disociación (k_{off}) para el globulímero A β (12-42) seleccionada a partir del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente 10^{-3} s^{-1} ; como máximo aproximadamente 10^{-4} s^{-1} ; como máximo aproximadamente 10^{-5} s^{-1} ; y como máximo aproximadamente 10^{-6} s^{-1} , tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial.

- 35 En un aspecto relacionado de la invención, la afinidad de la unión de las proteínas de unión descritas en este documento hacia el globulímero A β (20-42) es de aproximadamente 1,1 a 3 veces mayor que la afinidad de la unión de las proteínas de unión hacia el globulímero A β (12-42).

De acuerdo con un aspecto, las proteínas que se unen a A β de la presente invención se unen a al menos un globulímero A β , como se ha definido anteriormente y tienen una afinidad comparativamente menor hacia al menos una forma de no globulímero de A β . Las proteínas que se unen a A β de la presente invención con una afinidad comparativamente más baja hacia al menos una forma de no globulímero de A β que hacia al menos un globulímero A β , incluyen una proteína que se une a A β con una afinidad de unión hacia el globulímero A β (20-42) que es mayor que hacia un monómero A β (1-42). De acuerdo con un aspecto alternativo o adicional de la invención, la afinidad de la unión de la proteína que se une a A β hacia el globulímero A β (20-42), es mayor que hacia un monómero A β (1-40). En particular, la afinidad de las proteínas que se unen a A β hacia el globulímero A β (20-42) es mayor que su afinidad tanto hacia el monómero A β (1-40) como A β (1-42).

La expresión "monómero A β (X-Y)", tal y como se usa en este documento se refiere a la forma aislada del péptido A β (X-Y), en particular a una forma del péptido A β (X-Y), que no participa en interacciones esencialmente no covalentes con otros péptidos A β . Prácticamente, el monómero A β (X-Y) se proporciona generalmente en forma de una solución acuosa. En una realización particular de la invención, la solución acuosa del monómero contiene 0,05% a 0,2%, por ejemplo aproximadamente 0,1% de NH_4OH . En otra realización particular de la invención, la solución acuosa del monómero contiene 0,05% a 0,2%, por ejemplo, aproximadamente 0,1% de NaOH . Cuando se utiliza (por ejemplo, para una determinación de las afinidades de unión de las proteínas que se unen a A β de la presente invención), puede ser conveniente diluir dicha solución de una manera apropiada. Además, por lo general es conveniente utilizar dicha solución 2 horas, en particular 1 hora y especialmente 30 minutos después de su preparación.

Más específicamente, la expresión "monómero A β (1-40)" se refiere en este documento a una preparación de monómero A β (1-40), tal y como se describe en este documento y la expresión "monómero A β (1-42)" se refiere en este documento a una preparación de monómero A β (1-42), tal y como se describe en este documento.

Convenientemente, las proteínas que se unen a A β de la presente invención se unen a uno o a ambos monómeros con baja afinidad, por ejemplo con una K_D de 1×10^{-8} M o una afinidad más baja, por ejemplo, con una K_D de 3×10^{-8} M o una afinidad más baja, con una K_D de 1×10^{-7} M o una afinidad más baja, por ejemplo, con una K_D de 3×10^{-7} M o una afinidad más baja o con una K_D de 1×10^{-6} M o una afinidad más baja, por ejemplo, con una K_D de 3×10^{-5} M o una afinidad más baja, o con una K_D de 1×10^{-5} M o una afinidad más baja.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la afinidad de la unión de las proteínas que se unen a A β de la presente invención hacia el globulómero A β (20-42) es al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, al menos 1.000 veces, por ejemplo al menos 2.000 veces, al menos 3.000 veces o al menos 5.000 veces, al menos 10.000 veces, por ejemplo, al menos 20.000 veces, al menos 30.000 o al menos 50.000 veces o al menos 100.000 veces mayor que la afinidad de la unión de las proteínas que se unen a A β hacia uno o ambos monómeros.

La proteínas que se unen a A β de la presente invención que tienen una afinidad comparativamente menor hacia al menos una forma de no globulómero A β que hacia al menos un globulómero A β , incluyen además proteínas que se unen a A β que tienen una afinidad de unión hacia el globulómero A β (20-42) que es mayor que hacia las fibrillas A β (1-42). De acuerdo con un aspecto alternativo o adicional de la invención, la afinidad de la unión de las proteínas que se unen a A β hacia el globulómero A β (20-42) es mayor que hacia las fibrillas A β (1-40). De acuerdo con una realización particular, la invención se refiere a proteínas que se unen a A β que tienen una afinidad de la unión hacia el globulómero A β (20-42) que es mayor que su afinidad de la unión hacia las fibrillas A β (1-40) y A β (1-42).

El término "fibrilla" en este documento se refiere a una estructura molecular que comprende conjuntos de péptidos A β (X-Y) no asociados covalentemente, individuales, que muestran una estructura fibrilar en el microscopio electrónico, que ligan el rojo Congo y luego presentan birrefringencia con luz polarizada y cuyo patrón de difracción de rayos X es una estructura β en cruz. En otro aspecto de la invención, una fibrilla es una estructura molecular que se puede obtener por un procedimiento que comprende la agregación polimérica autoinducida de un péptido A β adecuado, en ausencia de detergentes, por ejemplo, en HCl 0,1 M, dando lugar a la formación de agregados con más de 24 o más de 100 unidades. Este procedimiento es bien conocido en la técnica. Convenientemente, las fibrillas A β (X-Y) se utilizan en forma de una solución acuosa. En una realización particular de la invención, la solución de fibrillas acuosa se prepara disolviendo el péptido A β en 0,1% de NH₄OH, diluyéndolo 1:4 con NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, seguido por un reajuste del pH a 7,4, incubando la solución a 37°C durante 20 h, seguido de centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos y resuspensión en NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La expresión "fibrilla A β (X-Y)" en el presente documento también se refiere a una fibrilla que comprende subunidades A β (X-Y) en donde, por ejemplo, como promedio, al menos el 90% de las subunidades son de tipo A β (X-Y), al menos el 98% de las subunidades son de tipo A β (X-Y) o el contenido de péptidos que no son A β (X-Y), está por debajo del umbral de detección. Más específicamente, la expresión "fibrilla A β (1-42)" en este documento se refiere a una preparación de fibrillas tal como se describe en el Ejemplo 3.

Convenientemente, las proteínas que se unen a A β de la presente invención se unen a una o ambas fibrillas con afinidad baja, por ejemplo, con una K_D de 1×10^{-8} M o menor afinidad, por ejemplo, con una K_D de 3×10^{-8} M o menor afinidad, con una K_D de 1×10^{-7} M o menor afinidad, por ejemplo, con una K_D de 3×10^{-7} M o menor afinidad o con una K_D de 1×10^{-6} M o menor afinidad, por ejemplo, con una K_D de 3×10^{-5} M o menor afinidad o con una K_D de 1×10^{-5} M o menor afinidad.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la afinidad de la unión de las proteínas que se unen a A β de la presente invención hacia el globulómero A β (20-42) es al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, al menos 1.000 veces, por ejemplo, al menos 2.000 veces, al menos 3.000 veces o al menos 5.000 veces, al menos 10.000 veces, por ejemplo, al menos 20.000 veces, al menos 30.000 o al menos 50.000 veces, o al menos 100.000 veces mayor que la afinidad de la unión de las proteínas que se unen a A β hacia una o ambas fibrillas.

Según una realización particular, la presente invención se refiere a proteínas que se unen a A β que tienen una afinidad comparativamente menor tanto hacia las formas monoméricas como fibrilares de A β , que hacia al menos un globulómero A β , en particular el globulómero A β (20-42). Estas proteínas que se unen a A β a veces se conocen como proteínas que se unen a A β específicas de globulómero.

Las proteínas de unión de la presente invención, por ejemplo, el anticuerpo humanizado 4D10 (4D10hum), incluyen proteínas que se unen específicamente a globulómeros que reconocen predominantemente las formas de globulómero A β (20-42) y preparaciones no convencionales de monómeros A β (1-40), monómeros A β (1-42), fibrillas A β o sAPP (es decir, precursor soluble de A β) en contraste con, por ejemplo, anticuerpos competidores tales como m266 y 3D6. Tal especificidad hacia los globulómeros es importante porque dirigir específicamente a una diana de una forma de globulómero de A β con 4D10 humanizado: 1) evitará dirigirse a dianas de depósitos amiloides insolubles, cuya unión puede explicar los efectos secundarios inflamatorios observados durante las inmunizaciones con A β insoluble; 2) ahorrará monómero A β y APP de los que se ha descrito que tienen funciones fisiológicas precognitivas (Plan et al., J Neurosci. 23: 5531-5535, 2003; y 3) aumentará la biodisponibilidad del anticuerpo, ya que no estará

escondido o inaccesible a través de una unión extensa a los depósitos insolubles.

PF-4 es una citocina pequeña, de 70 aminoácidos que pertenece a la familia de quimiocinas CXC y también se conoce como ligando 4 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL4). PF-4 se libera desde los gránulos alfa de plaquetas activadas durante la agregación de plaquetas y favorece la coagulación de la sangre mediante una moderación de los efectos de moléculas similares a la heparina. Debido a estas funciones, se predice que está implicado en la reparación de heridas y la inflamación (Eismann et al., Blood 76(2): 336-44, 1990). PF-4 se encuentra generalmente en un complejo con proteoglicanos y puede formar complejos con la heparina anticoagulante que se emplea como tratamiento farmacológico de la trombosis. Tiene una función patológica bien descrita en la trombocitopenia inducida por heparina (HIT), una reacción autoinmune idiosincrática frente a la administración de heparina anticoagulante (Warkentin, N. Engl. J. Med. 356(9): 891-3, 2007), en donde el complejo heparina:PF4 es el antígeno. Autoanticuerpos de PF4 también se han encontrado en pacientes con trombosis y características que se asemejan a HIT pero no antes de la administración de heparina (Warkentin et al., Am. J. Med. 121(7): 632-6, 2008). Una trombocitopenia inducida por heparina se caracteriza por el desarrollo de trombocitopenia (un recuento bajo de plaquetas) y además la HIT predispone a la trombosis. En vista de estas funciones y la participación de PF-4 en procesos patológicos, se puede concluir que la administración de proteínas de unión (por ejemplo, anticuerpos) que muestran una unión (por ejemplo, reactividad cruzada) al PF-4 presente en un sujeto, puede afectar a dichas funciones de PF-4 y por lo tanto dar lugar a efectos adversos (secundarios). El grado y la naturaleza de tales efectos adversos pueden variar dependiendo de parámetros tales como la ubicación y el tamaño del epítipo sobre PF-4, la fuerza de la unión y la naturaleza de la proteína de unión respectiva.

Según un aspecto de la invención, las proteínas de unión de la presente invención no muestran ninguna unión o una baja al factor plaquetario 4 (PF-4). Dicha reacción cruzada con PF-4 se puede evaluar mediante el uso de inmunoensayos normalizados *in vitro* tales como ELISA, transferencia de puntos o análisis BIAcore.

De acuerdo con una realización particular, la reacción cruzada con PF-4 de una proteína de unión definida en este documento, se refiere a la proporción de valores para dicha proteína de unión y un anticuerpo anti-PF-4 de referencia obtenido mediante (i) la realización de un ELISA de tipo sándwich con una serie de diluciones ~ 1:3 de plasma humano o de macaco cangrejero desde aproximadamente 1:3,16 a aproximadamente 1:3160 (dilución plasmática final) (por ejemplo, como se describe en los ejemplos 3.1 y 3.2), (ii) el trazado del gráfico de la señal detectada (eje y) frente a diluciones plasmáticas transformadas en logaritmo (eje x) y (iii) la determinación del área bajo la curva (AUC o área pico total) a partir de estos datos no ajustados a la curva en el intervalo medido (diluciones plasmáticas finales desde aproximadamente 1:3,16 a aproximadamente 1:3160). Según una realización particular de la invención, la determinación de la reacción cruzada con PF-4 mediante ELISA de tipo sándwich comprende lo siguiente: una cierta cantidad de la proteína de unión que se investiga o el anticuerpo anti-PF-4 de referencia o, convenientemente, una dilución apropiada del mismo, por ejemplo 100 µl de 10 µg/ml de una proteína de unión o una solución de anticuerpo en hidrogenocarbonato de sodio 100 mM, pH 9,6, se utiliza para recubrir los pocillos de una placa de microtitulación para adsorción de proteína; a continuación, se lava la placa, se bloquea y se lava de nuevo; a continuación, se pone en contacto con una serie de diluciones ~1:3 de plasma de macaco cangrejero o plasma humano, por ejemplo, plasma humano enriquecido con PF-4 humano, desde aproximadamente 1:3,16 a aproximadamente 1:3160 (dilución plasmática final), seguido por la detección de PF-4 unido a cada pocillo, por ejemplo, por medio de un anticuerpo primario específico de PF-4, un anticuerpo secundario conjugado con enzima y una reacción colorimétrica.

Un "anticuerpo anti-PF-4 de referencia", tal y como se usa en este documento, es un anticuerpo, especialmente un anticuerpo monoclonal, que es específicamente reactivo con PF-4, en particular humano (HPF4). Un anticuerpo de este tipo se puede obtener al proporcionar un antígeno que comprende PF-4 humano, por ejemplo, PF-4 humano que tiene la secuencia de aminoácidos EAEEDGDLQCLCVKTTTSQVRPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNRKLCLDLQAP LYKKIHKLLLES (SEQ ID NO: 70), exponiendo un repertorio de anticuerpos a dicho antígeno y seleccionando entre dicho repertorio de antígenos un anticuerpo que se une específicamente a PF-4 humano. El anticuerpo se puede purificar opcionalmente por afinidad, utilizando el inmunógeno (PF-4 humano). Tales anticuerpos anti-PF4 de referencia están disponibles comercialmente, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-HPF4, Abcam nº de cat.: ab49735.

De acuerdo con otra realización particular, la reacción cruzada con PF-4 de una proteína de unión definida en esta memoria, se refiere a la relación de valores de AUC para dicha proteína de unión y un anticuerpo anti-PF-4 de referencia que se obtiene (i) efectuando un ELISA de tipo sándwich alineado con una dilución en serie ~1:3 de plasma humano o de macaco cangrejero, de proteína de unión y anticuerpo anti-PF-4 de referencia desde aproximadamente 10 mg/ml a paro 10000 ng/ml (concentración final) (por ejemplo, como se describe en los ejemplos 3.3 y 3.4), (ii) realizando un gráfico de la señal detectada (eje y) frente a concentraciones transformadas en logaritmo proteína de unión o anticuerpo anti-PF-4 de referencia (eje x) y (iii) determinando el área bajo la curva (AUC o área pico total) a partir de esos datos no ajustados a la curva en el intervalo medido (concentraciones de proteína de unión o anticuerpo de referencia desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 10000 ng/ml). De acuerdo con una realización particular de la invención, la determinación de la reacción cruzada de PF-4 mediante un ELISA de tipo sándwich alineado comprende lo siguiente: los pocillos de una placa de microtitulación de proteína mediante adsorción se recubren con una cierta cantidad de un anticuerpo de alineación adecuado para capturar la proteína de unión en investigación y el anticuerpo anti-PF-4 de referencia, por ejemplo 100 µl/pocillo de IgG anti-ratón específica de Fc

a 50 µg/ml, Sigma nº de cat.: M3534, en hidrogenocarbonato de sodio 100 mM, pH 9,6); a continuación, se lava la placa, se bloquea y se lava de nuevo; a continuación, se pone en contacto con una serie de diluciones ~1:3 de la proteína de unión en investigación o el anticuerpo anti-PF-4 de referencia desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 10.000 ng/ml (concentración final); después de otra etapa de lavado la placa se pone en contacto, por ejemplo, con plasma humano o de macaco cangrejero diluido 1:10, por ejemplo, plasma humano enriquecido con PF-4 humano, seguido por la detección de PF-4 unido a la placa, por ejemplo, por medio de un anticuerpo primario específico de PF-4, un anticuerpo secundario conjugado con enzima y una reacción colorimétrica.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la reacción cruzada de la proteína que se une a Aβ de la presente invención con PF-4, cuando se analizaba a través de un ELISA de tipo sándwich con plasma de macaco cangrejero como se describe en este documento, es menor que la correspondiente reacción cruzada de un anticuerpo anti-PF-4 de referencia, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o al menos 30 veces menor; y/o cuando se analizaba a través de un ELISA de tipo sándwich con plasma humano como se describe en el presente documento, es menor que la correspondiente reacción cruzada de un anticuerpo anti-PF-4 de referencia, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces menor.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la reacción cruzada de la proteína que se une a Aβ de la presente invención con PF-4, cuando se analizaba a través de ELISA de tipo sándwich alineado con plasma de macaco cangrejero como se describe en el presente documento, es menor que la reacción cruzada correspondiente de un anticuerpo anti-PF-4 de referencia, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 80 veces o al menos 115 veces menor; y/o cuando se analizaba a través de ELISA de tipo sándwich alineado con plasma humano como se describe en el presente documento, es menor que la correspondiente reacción cruzada de un anticuerpo anti-PF-4 de referencia, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces menor.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la reacción cruzada de la proteína que se une a Aβ de la presente invención con PF-4, cuando se analizaba a través de ELISA de tipo sándwich y un ELISA de tipo sándwich alineado con plasma de macaco cangrejero como se describe en el presente documento, es menor que la correspondiente reacción cruzada de un anticuerpo anti-PF-4 de referencia, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o al menos 30 veces menor.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la reacción cruzada de la proteína que se une a Aβ de la presente invención con PF-4, cuando se analizaba a través de un ELISA de tipo sándwich y se alineaba con un ELISA de tipo sándwich con plasma humano como se describe en el presente documento, es menor que la correspondiente reacción cruzada de un anticuerpo anti-PF-4 de referencia, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o al menos 30 veces menor.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la reacción cruzada de la proteína que se une a Aβ de la presente invención con PF-4, cuando se analizaba a través de ELISA de tipo sándwich y un ELISA de tipo sándwich alineado con plasma de macaco cangrejero y humano como se describe en el presente documento, es menor que la correspondiente reacción cruzada de un anticuerpo anti-PF-4 de referencia, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o al menos 30 veces menor.

El término "polipéptido" tal y como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" incluye proteínas naturales o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de obtención, no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado natural; está sustancialmente exento de otras proteínas de la misma especie; se expresa a través de una célula de una especie diferente; o no se produce en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetizaba en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina naturalmente, estará "aislado" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también se puede volver sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural, mediante un aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

El término "recuperación", tal y como se usa en el presente documento, se refiere al procedimiento de hacer que una especie química, tal como un polipéptido, esté sustancialmente exenta de componentes asociados de forma natural mediante un aislamiento, por ejemplo, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

Las expresiones "unión específica" o "que se une específicamente", tal y como se usan en el presente documento, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico

o un epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas, en general. Si un anticuerpo es específico de un epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

5 El término "anticuerpo", tal y como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) o cualquier fragmento, mutante, variante o derivado de las mismas que sea funcional, que conserve las características esenciales de una molécula de Ig que se une a un epítipo. Un fragmento, mutante, variante o formatos de anticuerpo derivados que son funcionales, son conocidos en la técnica. Sus realizaciones no limitantes se describen a continuación. Un "anticuerpo de longitud completa", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de Ig que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cadenas están normalmente unidas entre sí mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (también denominada en este documento "cadena pesada variable" o de forma abreviada en el presente documento HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (también denominada en este documento "cadena ligera variable" o de forma abreviada en este documento LCVR o VL) y región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

Las expresiones "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), "resto que se une a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "resto de anticuerpo"), tal y como se usan en el presente documento, se refieren a uno o varios fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, el globulímero A β (20-42)), es decir, son fragmentos funcionales de un anticuerpo. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede estar realizada por uno o varios fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales realizaciones de anticuerpo también pueden ser biespecíficas, doblemente específicas o multiespecíficas, uniéndose específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989; Winter et al., documento WO 90/05144 A1), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, se pueden unir usando métodos recombinantes, a través de un enlazador sintético que les permite que se formen como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)); véase por ejemplo, Bird et al., Science 242: 423-426, 1988; y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883, 1988). Tales anticuerpos de cadena sencilla también se incluyen dentro de la expresión "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos, también están incluidas. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan sobre una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993; Poljak et al., Structure 2: 1121-1123, 1994). Tales porciones que se unen a anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel ed., Antibody Engineering, Springer-Verlag, Nueva York, 790 pp., 2001, ISBN 3-540-41354-5).

El término "anticuerpo", tal y como se usa en este documento, también comprende estructuras artificiales de anticuerpo. La expresión "estructura artificial de anticuerpo" tal como se utiliza en este documento, se refiere a un polipéptido que comprende una o varias porciones que se unen a antígeno de un anticuerpo de la invención unido a un polipéptido enlazador o a un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazadores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para enlazar una o varias porciones que se unen a antígeno. Tales polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993; Poljak et al., Structure 2: 1121-1123, 1994).

Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Secuencias de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera de IgG humana son conocidas en la técnica y se representan en la Tabla 1.

TABLA 1: SECUENCIA DEL DOMINIO CONSTANTE DE LA CADENA PESADA Y DEL DOMINIO CONSTANTE DE LA CADENA LIGERA DE IgG HUMANA

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO:25	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
región constante de Ig gamma-1 mutante	SEQ ID NO:26	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
región constante de Ig Kappa	SEQ ID NO:27	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSYSTLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
		123456789012345678901234567890
región constante de Ig lambda	SEQ ID NO:28	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

5 Aún más, una proteína de unión de la presente invención (es decir, un anticuerpo) puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por una asociación covalente o no covalente de la proteína de unión de la invención con una o varias otras proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para formar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas, 6: 93-101, 1995) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para formar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al., Mol. Immunol., 31: 1047-1058, 1994). Porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, las porciones de anticuerpo y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas convencionales de ADN recombinante, como se describen en el presente documento.

10 Un "anticuerpo aislado", tal y como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a un anticuerpo que

está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al globulímero A β (20-42) puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como globulímeros A β , por ejemplo, el globulímero A β (12-42) u otras formas de A β . Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana.

La expresión "anticuerpo humano" tal y como se usa en el presente documento, se entiende que incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y en particular en CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano" tal y como se usa en el presente documento, se entiende que no incluye anticuerpos en los que las secuencias de CDR obtenidas a partir de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado sobre secuencias de la región estructural humana.

La expresión "anticuerpo humano recombinante" tal y como se usa en el presente documento se entiende que incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (descrito adicionalmente en la Sección B, más abajo), anticuerpos aislados a partir de un banco de anticuerpos humanos, recombinante, combinatorio (Hoogenboom, TIB Tech., 15: 62-70, 1997; Azzazy y Highsmith, Clin. Biochem., 35: 425-445, 2002; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques, 29: 128-145; Hoogenboom H., y Chames P., Immunology Today, 21: 371-378), anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor L. D., et al., (1992) Nucl. Acids Res., 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L., (2002) Current Opinion in Biotechnology, 13: 593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique un corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Tales anticuerpos humanos recombinantes se puede someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes, son secuencias que, aunque se han obtenido y están relacionadas con secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera murinas ligadas a regiones constantes humanas.

La expresión "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie, pero en los que las secuencias de una o varias de las regiones CDR de VH y/o VL se sustituyen por secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen CDRs murinas (por ejemplo, CDR3) en las que una o varias de las regiones de cadena pesada y ligera variable murinas ha sido reemplazadas por secuencias de la cadena pesada y ligera variable humana.

Las expresiones "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcación de Kabat" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos, que están reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción del mismo que se une a un antígeno (Kabat et al., (1971) Ann. NY Acad. Sci., 190: 382-391 y Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication n° 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende desde las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable se extiende desde las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Tal y como se usa en el presente documento, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o a la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o el 100% de las secuencias de aminoácidos de una o varias de las regiones estructurales. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica la o las regiones constantes. En aún otra realización, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica una o varias de las regiones estructurales y la o las regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de un anticuerpo que proporciona o codifica al menos 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o el 100% de las secuencias de aminoácidos de una o varias de las regiones estructurales. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 residuos de aminoácidos que no están

presentes en una o varias posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región estructural aceptora y/o una o varias regiones constantesceptoras, por ejemplo, se pueden derivar u obtener a partir de un gen de anticuerpo de la línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo o anticuerpos disponibles comercialmente).

5 Tal y como se usa en el presente documento, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpos. Hay tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. La expresión "conjunto de CDR" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un grupo de tres CDRs que se producen en una sola región variable, capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs se han definido de manera diferente según distintos sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco, aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDRs. A estas CDRs se puede hacer referencia como CDRs de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); y Chothia et al., *Nature*, 342:877-883 (1989)) encontraron que ciertas subporciones dentro de las CDRs de Kabat adoptan conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, en donde la "L" y la "H" designan las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente. A estas regiones se puede hacer referencia como CDRs de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDRs de Kabat. Otros límites que definen el solapamiento de las CDRs con las CDRs de Kabat, han sido descritos por Padlan et al. (*FASEB J.*, 9:133-139 (1995)) y MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-745 (1996)). Aún otras definiciones de límites de CDR puede que no sigan estrictamente uno de los sistemas anteriores pero, no obstante, se solapan con las CDRs de Kabat, aunque se pueden acortar o alargar según la predicción o los hallazgos experimentales de residuos particulares o grupos de residuos, o incluso CDRs enteras no afectan significativamente a la unión al antígeno. Los métodos utilizados en el presente documento pueden utilizar CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, realizaciones particulares utilizan CDRs definidas por Kabat o Chothia.

Tal y como se utiliza en este documento, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o una región estructural que define una estructura de CDR canónica particular, tal como está definida por Chothia et al. (*J. Mol. Biol.*, 196:901-907 (1987); Chothia et al., (*J. Mol. Biol.*, 227:799 (1992)). De acuerdo con Chothia et al., las porciones decisivas de las CDRs de muchos anticuerpos tienen confirmaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de la gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica específica principalmente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un bucle.

Tal y como se emplea en el presente documento, los términos "donante" y "anticuerpo donante" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o varias CDRs. En una realización, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente a la del anticuerpo a partir del cual se obtienen o derivan las regiones estructurales. En el contexto de un anticuerpo humanizado, la expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o varias CDRs.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "región estructural" o "secuencia de la región estructural" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR se puede determinar por diferentes sistemas, el significado de una secuencia de la región estructural está sujeto a diferentes interpretaciones de forma correspondiente. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2 y -L3 de la cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones estructurales en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en donde CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3 y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región estructural, tal y como está indicada por otros, representa las FRs combinadas dentro de la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina, de origen natural. Tal y como se usa en este documento, una FR representa una de las cuatro subregiones y FRs representa dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región estructural.

Las secuenciasceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humana se conocen en la técnica. En una realización de la invención, las secuenciasceptoras de la cadena pesada y de la cadena ligera humana se seleccionan a partir de las secuencias descritas en la Tabla 2 y la Tabla 3. En otra realización, las secuenciasceptoras de la cadena pesada y de la cadena ligera humana se seleccionan a partir de secuencias que son al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idénticas a las secuencias descritas en la Tabla 2 y la Tabla 3.

TABLA 2: SECUENCIAS ACEPTORAS DE LA CADENA PESADA

SEQ ID NO	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
34	VH3_53/JH6 FR1	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS
35	VH3_53/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
		123456789012345678901234567890
36	VH3_53/JH6 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AR
37	VH3_53/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
38	VH4_59/JH6 FR1	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSIS
39	VH4_59/JH6 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
40	VH4_59/JH6 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYC AR
41	VH4_59/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

TABLA 3: SECUENCIAS ACEPTORAS DE LA CADENA LIGERA

SEQ ID NO	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
42	A1/2-30/Jk2 FR1	DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISC
43	A1/2-30/Jk2 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
44	A1/2-30/Jk2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVY YC
45	A1/2-30/Jk2 FR4	FGQG TKLEIKR

5 Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "gen de un anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento génico" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce a una reorganización genética y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Véase, por ejemplo, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol., 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv. Exp. Med. Biol., 484: 13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la
10 presente invención parte del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal son más propensos que los genes de anticuerpos maduros a conservar estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales, características de individuos en las especies, por lo tanto, tienen menos probabilidades de ser reconocidos como procedentes de una fuente ajena cuando se usan terapéuticamente en esa especie.

15 Tal y como se utiliza en este documento, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen un mayor impacto sobre la especificidad y/o la afinidad de la unión de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no se limita a, uno o varios de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser o bien un sitio de N-glicosilación u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre una región variable de la cadena pesada y una
20 región variable de la cadena ligera, un residuo dentro de la zona de Vernier y un residuo en la región que se solapa entre la definición de Chothia de una CDR1 de la cadena pesada variable y la definición de Kabat de la primera región estructural de la cadena pesada.

25 Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o porción del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región estructural (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Tal y como se utiliza en este documento, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR, se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un
30 anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios va-

riables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, un anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de consenso de una inmunoglobulina humana. De acuerdo con un aspecto, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o de una cadena pesada.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar dominios constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas usando métodos bien conocidos en la técnica.

Las regiones estructurales y CDR de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponderse exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o la región estructural de consenso se pueden mutagenizar mediante sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido, por lo que el residuo de la CDR o estructural en ese sitio no se corresponde con el anticuerpo donante o la región estructural de consenso. En una realización, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Por lo general, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de los residuos del anticuerpo humanizado se corresponderán con los de las secuencias de FR y CDR parentales. Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "región estructural de consenso" se refiere a la región estructural en la secuencia de inmunoglobulina de consenso. Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "secuencia de inmunoglobulina de consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos que están presentes más frecuentemente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987)). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido presente con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos están presentes con igual frecuencia, ambos se pueden incluir en la secuencia de consenso.

Tal y como se usa en este documento, la zona de "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos estructurales que pueden acomodar una estructura de CDR y poner a punto el ajuste con un antígeno como se describe en Foote y Winter (1992), J. Mol. Biol., 224: 487-499). Los residuos de la zona de Vernier forman una capa subyacente a las CDRs y pueden tener un efecto sobre la estructura de las CDRs y la afinidad del anticuerpo.

El término "anticuerpo", tal y como se usa en el presente documento, comprende también proteínas de unión multivalente. El término "proteína de unión multivalente" se utiliza en esta memoria descriptiva para indicar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente está diseñada genéticamente para tener tres o más sitios de unión a antígeno y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. La expresión "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Proteínas que se unen a un dominio variable doble (DVD), tal y como se usan en este documento, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Tales DVDs pueden ser monoespecíficos, es decir, capaces de unirse a un antígeno o multiespecíficos, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas que se unen a DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera se denominan una Ig DVD. Cada mitad de una Ig DVD comprende un polipéptido DVD de cadena pesada y un polipéptido DVD de cadena ligera y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDRs que participan en la unión al antígeno por cada sitio de unión a antígeno. Las proteínas de unión a DVD y los métodos para preparar proteínas que se unen a DVD, se describen en el documento de Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20070071675.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de linfocitos T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítipos incluyen agrupaciones de superficies químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une con una proteína de unión, en particular con un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que una proteína de unión o un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferencialmente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

Las afinidades de unión de los anticuerpos de la invención se pueden evaluar mediante el uso normalizado de inmunoensayos *in vitro* tales como ELISA, transferencia de puntos o análisis BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Jönsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; y Jönsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

De acuerdo con una realización particular, las afinidades definidas en este documento se refieren a los valores obtenidos mediante la realización de una transferencia de puntos y su evaluación por densitometría. Según una realización particular de la invención, la determinación de la afinidad de la unión por transferencia de puntos comprende lo siguiente: una cierta cantidad del antígeno (por ejemplo, el globulímero A β (X-Y), monómero A β (X-Y) o fibrillas A β (X-Y), como se han definido anteriormente) o, convenientemente, una dilución apropiada de los mismos, por ejemplo en NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA a una concentración de antígeno de, por ejemplo, 100 pmol/ μ l, 10 pmol/ μ l, 1 pmol/ μ l, 0,1 pmol/ μ l y 0,01 pmol/ μ l, forma un punto sobre una membrana de nitrocelulosa, la membrana se bloquea entonces con leche para evitar una unión no específica y se lava, a continuación, se pone en contacto con el anticuerpo de interés seguido de una detección de este último por medio de un anticuerpo secundario conjugado con una enzima y una reacción colorimétrica; con concentraciones de anticuerpo definidas, la cantidad de anticuerpo unido permite la determinación de la afinidad. De este modo, la afinidad relativa de dos anticuerpos diferentes hacia una diana o de un anticuerpo hacia dos dianas diferentes, se define en este documento como la relación de las cantidades respectivas de anticuerpo unido a la diana observada con las dos combinaciones de anticuerpo-diana, en condiciones de transferencia de puntos, por lo demás, idénticas. A diferencia de un enfoque similar basado en la transferencia Western, el enfoque de transferencia de puntos determinará la afinidad de un anticuerpo hacia una diana determinada en la conformación natural de esta última; a diferencia del enfoque de ELISA, el enfoque de transferencia de puntos no padece las diferencias en las afinidades entre diferentes dianas y la matriz, permitiendo con ello comparaciones más precisas entre diferentes dianas.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real, mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véanse, Jönsson, U., et al., (1993) *Ann. Biol. Clin.*, 51: 19-26; Jönsson et al., (1991) *BioTechniques*, 11:620-627; Jönsson et al., (1995) *J. Mol. Recognit.*, 8: 125-131; y Jönsson et al., (1991) *Anal. Biochem.*, 198:268-277.

El término "k_{on}" (también "Kon", "kon", "K_{on}"), tal y como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a la constante de la tasa de asociación para la asociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) con un antígeno para formar un complejo de asociación, por ejemplo, un complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica. La "k_{on}" también se conoce por los términos de "constante de la tasa de asociación", o "ka", como se usa indistintamente en este documento. Este valor indica la tasa de unión de una proteína de unión (p. ej., un anticuerpo) con su antígeno diana o la tasa de formación de complejo entre una proteína de unión (p. ej., un anticuerpo) y un antígeno como se muestra por la ecuación a continuación:



El término "K_D" (también "K_d" o "KD"), tal y como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a la "constante de disociación en equilibrio" y se refiere al valor obtenido en una medición de la titulación en equilibrio, o dividiendo la constante de la tasa de disociación (k_{off}) por la constante de la tasa de asociación (k_{on}). La constante de la tasa de asociación (k_{on}), la constante de la tasa de disociación (k_{off}) y la constante de disociación en equilibrio (K_D) se utilizan para representar la afinidad de la unión de una proteína de unión (p. ej., un anticuerpo) con un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de la tasa de asociación y disociación son bien conocidos en la técnica. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece una sensibilidad elevada y la capacidad de examinar muestras en tampones fisiológicos en equilibrio. Otros enfoques experimentales e instrumentos tales como un ensayo BIAcore[®] (análisis de la interacción biomolecular) se pueden utilizar (por ejemplo, un instrumento disponible en BIAcore International AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Además, un ensayo KinExA[®] (Ensayo de Exclusión Cinética), disponible en Savidyne Instruments (Boise, Idaho) también se puede utilizar.

La expresión "proteína de unión marcada", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de unión con un marcador incorporado que proporciona la identificación de la proteína de unión. Asimismo, la expresión "anticuerpo marcado" tal y como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo con un marcador incorporado que proporciona la identificación del anticuerpo. En un aspecto, el marcador es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación a un polipéptido de restos de biotínulo que pueden detectarse con avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que se puede detectar con métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho o ¹⁵³Sm); marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotínulo; epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de parejas de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítopos); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "anticuerpo", tal y como se usa en este documento, también comprende conjugados de anticuerpos. La expresión "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, ligada químicamente a un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico.

La expresión "agente terapéutico" se usa en este documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto a base de materiales biológicos que es un "fármaco potenciador cognitivo", que es un fármaco que mejora las capacidades cognitivas humana alteradas del cerebro (es decir, el pensamiento, el aprendizaje y la memoria). Los fármacos potenciadores cognitivos actúan mediante una alteración de la disponibilidad de los agentes neuroquímicos (por ejemplo, neurotransmisores, enzimas y hormonas), mediante la mejora del suministro de oxígeno, mediante la estimulación del crecimiento nervioso o mediante la inhibición del daño a los nervios. Ejemplos de fármacos potenciadores cognitivos incluyen un compuesto que aumenta la actividad de la acetilcolina tal como, pero no limitado a, un agonista del receptor de acetilcolina (por ejemplo, un agonista del receptor nicotínico α -7 o un modulador alostérico, un agonista del receptor nicotínico α 4 β 2 o moduladores alostéricos), un inhibidor de la acetilcolinesterasa (p. ej., donepezil, rivastigmina y galantamina), un inhibidor de la butirilcolinesterasa, un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (p. ej., memantina), un agonista de la proteína neuroprotectora dependiente de actividad (ADNP), un agonista del receptor de serotonina 5-HT_{1A} (p. ej., xaliproden), un agonista del receptor de 5-HT₄, un antagonista del receptor de 5-HT₆, un antagonista del receptor de serotonina 1A, un antagonista del receptor de histamina H₃, un inhibidor de calpaína, una proteína o agonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor de crecimiento trófico, un compuesto anti-apoptótico, un activador del receptor de glutamato de tipo AMPA, un bloqueador o modulador del canal de calcio de tipo L o de tipo N, un bloqueador del canal de potasio, un activador del factor inducible por hipoxia (HIF), un inhibidor de la HIF pro-lil-4-hidroxilasa, un agente anti-inflamatorio, un inhibidor del péptido amiloide A β o de la placa amiloide, un inhibidor de la hiperfosforilación de tau, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (p. ej., tadalafil, sildenafil), un inhibidor de la fosfodiesterasa 4, un inhibidor de la monoamina oxidasa, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Ejemplos específicos de tales fármacos potenciadores cognitivos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la colinesterasa tales como donepezil (Aricept[®]), rivastigmina (Exelon[®]), galantamina (Reminyl[®]), antagonistas de N-metil-D-aspartato tales como memantina (Namenda[®]).

Los términos "cristal" y "cristalizado" tal y como se utilizan en esta memoria, se refieren a una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo o una porción del mismo que se une a antígeno), que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de estado sólido de la materia que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de matrices regulares tridimensionales que se repiten, de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o combinaciones moleculares (por ejemplo, complejos de antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se conocen bien en el campo. La unidad fundamental, o elemento estructural que se repite en un cristal, se llama unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se conforma con una simetría cristalográfica dada bien definida, proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria mediante translaciones regulares en las tres dimensiones, proporciona el cristal. Véase, Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2^a ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, 1999).

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "neutralizar" se refiere a una neutralización de la actividad biológica de una forma de A β seleccionada como diana cuando una proteína de unión se une específicamente a dicha forma de A β . Por ejemplo, una proteína de unión neutralizante es un anticuerpo neutralizante cuya unión a la región de aminoácidos A β (20-42) del globulómero (y/o a cualquier otra forma de A β seleccionada como diana) produce como resultado la inhibición de una actividad biológica del globulómero. Según un aspecto de la invención, la proteína de unión neutralizante se une a la región A β (20-42) del globulómero (y/o a cualquier otra forma de A β seleccionada como diana) y reduce una actividad biológica de la forma de A β seleccionada como diana en al menos aproximadamente un 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. La inhibición de una actividad biológica de la forma de A β seleccionada como diana mediante una proteína de unión neutralizante se puede determinar midiendo uno o varios indicadores de la actividad biológica de la forma de A β seleccionada como diana, bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la interacción (p. ej., la unión) de la forma de A β seleccionada como diana a un canal de calcio presináptico regulado por voltaje de tipo P/Q, la inhibición de la actividad del canal de calcio presináptico regulado por voltaje de tipo P/Q, el flujo de Ca⁺⁺ a través del canal de calcio presináptico regulado por voltaje de tipo P/Q, la concentración local (p. ej., intracelular) de Ca⁺⁺, la actividad sináptica.

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad de unión/afinidad de una proteína de unión, en particular de un anticuerpo, hacia un antígeno, por ejemplo, un globulómero A β (20-42) (y cualquier otra forma de A β seleccionada como diana); y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo cuya unión a una forma de A β seleccionada como diana inhibe la actividad biológica de la forma de A β seleccionada como diana. Dicha actividad biológica de la forma de A β seleccionada como diana comprende la interacción de la forma de A β con el canal de calcio presináptico regulado por voltaje de tipo P/Q, lo que da lugar a una inhibición de la actividad de dichos canales de calcio.

La presente invención también proporciona secuencias de nucleótidos aisladas que codifican las proteínas de unión de la presente invención. La presente descripción también proporciona las secuencias de nucleótidos (o sus fragmentos) que tienen secuencias que comprenden, se corresponden a, son idénticas a, se pueden hibridar con o son complementarias a, con al menos aproximadamente 70% (por ejemplo, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% o 79%), al menos aproximadamente 80% (por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% o 89%) o al menos aproximadamente 90% (por ejemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad con esas secuencias de nucleótidos codificantes. (Todos los números enteros (y porciones de

los mismos) entre e incluyendo 70% y 100% se consideran dentro del alcance de la presente invención con respecto al porcentaje de identidad). Tales secuencias se pueden obtener a partir de cualquier fuente (por ejemplo, ya sea que se aíslan a partir de una fuente natural, se producen a través de una ruta semisintética o se sintetizan *de novo*). En particular, tales secuencias se pueden aislar u obtener a partir de fuentes distintas de las descritas en los ejemplos (por ejemplo, bacterias, hongos, algas, ratón o ser humano).

Para los fines de la presente descripción, un "fragmento" de una secuencia de nucleótidos se define como una secuencia contigua de aproximadamente al menos 6, por ejemplo, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 10 nucleótidos o al menos aproximadamente 15 nucleótidos, que se corresponden con una región de la secuencia de nucleótidos especificada.

El término "identidad" se refiere al parentesco entre dos secuencias sobre una base de nucleótido a nucleótido a través de una ventana o segmento de comparación en particular. Por ello, la identidad se define como el grado de igualdad, correspondencia o equivalencia entre las mismas hebras (ya sean sentido o antisentido) de dos segmentos de ADN (o dos secuencias de aminoácidos). El "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una región particular, determinando el número de posiciones en las que aparece la base o el aminoácido idéntico en ambas secuencias, con el fin de obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de esas posiciones por el número total de posiciones en el segmento que se compara y multiplicando el resultado por 100. Una alineación óptima de secuencias se puede realizar mediante el algoritmo de Smith y Waterman, *Appl. Math.* 2: 482, 1981, mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, por el método de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444, 1988 y con programas de ordenador que implementan los algoritmos relevantes (por ejemplo, Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>); Higgins et al., *CABIOS*. 5L151-153, 1989), FASTDB (Intelligentics), BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul et al., *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402, 1997), PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) o GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI)). (Véase el documento de Patente de Estados Unidos nº 5.912.120).

Para los fines de la presente descripción, "complementariedad" se define como el grado de parentesco entre dos segmentos de ADN. Se determina midiendo la capacidad de la cadena sentido de un segmento de ADN para hibridarse con la hebra antisentido del otro segmento de ADN, en condiciones apropiadas, para formar una doble hélice. Un "complemento" se define como una secuencia que se empareja con una secuencia dada basándose en las reglas de emparejamiento de bases canónicas. Por ejemplo, una secuencia A-G-T en una hebra de nucleótidos es "complementaria" a T-C-A en la otra hebra. En la hélice doble, cuando una adenina aparece en una hebra, una timina aparece en la otra hebra. Del mismo modo, cuando una guanina se encuentra en una hebra, una citosina se encuentra en la otra. Cuanto mayor es el parentesco entre las secuencias de nucleótidos de dos segmentos de ADN, mayor es la capacidad para formar dúplex híbridos entre las hebras de los dos segmentos de ADN.

Una "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos idénticos, así como conservados en ambas secuencias. Cuanto mayor sea el grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos, mayor será la correspondencia, igualdad o equivalencia de las dos secuencias. (La "identidad" entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos exactamente iguales o invariables en ambas secuencias). Las definiciones de "complementariedad", "identidad" y 'similitud' son bien conocidas por los expertos ordinarios en la técnica.

"Codificado por" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptido, en donde la secuencia de polipéptido o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos, por ejemplo, al menos 8 aminoácidos o al menos 15 aminoácidos, procedentes de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

El término "polinucleótido" tal y como se emplea en este documento, significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

La expresión "polinucleótido aislado" tal y como se usa en este documento, significa un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, ADNc o de origen sintético o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no está asociado con todo un polinucleótido o una porción del mismo, con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está ligado funcionalmente a un polinucleótido con el que no está ligado en la naturaleza; o no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más larga.

El término "vector", tal y como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospede-

5 dadora después de la introducción en la célula hospedadora y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente. Sin embargo, la invención incluye otras formas de este tipo de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

10 La expresión "ligado funcionalmente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite actuar de la manera pretendida. Una secuencia de control "ligada funcionalmente" a una secuencia codificante, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "ligadas funcionalmente" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. La expresión "secuencia de control de la expresión" tal y como se emplea en este documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de iniciación, de terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, una secuencia de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. La expresión "secuencias de control" se entiende que incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de ligandos de fusión.

20 "Transformación", tal y como se define en el presente documento, se refiere a cualquier proceso por el que un ADN exógeno entra en una célula hospedadora. La transformación puede tener lugar en condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extraño en una célula hospedadora procariota o eucariota. El método se selecciona basándose en la célula hospedadora que está siendo transformada y puede incluir, pero no se limita a, una infección vírica, electroporación, lipofección y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable en las que el ADN insertado es capaz de replicarse ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma hospedador. También incluyen células que expresan transitoriamente el ADN o el ARN insertado durante períodos de tiempo limitados.

30 La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), se entiende que se refiere a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Se debe entender que tales expresiones se refieren no solo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a una mutación o a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal y como se usa en el presente documento. En un aspecto, las células hospedadoras incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas a partir de cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotas incluyen células de protistas, hongos, plantas y animales. En otro aspecto, las células hospedadoras incluyen, pero no se limitan a, la línea celular procariota *E. coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

40 Se pueden emplear técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se hace comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se pueden realizar generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

55 Un "organismo transgénico", tal y como se conoce en la técnica y se emplea en este documento, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén introducido en el organismo (o en un ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa de forma natural en el organismo. Un "transgén" es una estructura artificial de ADN, que es estable y está integrada funcionalmente en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o varios tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

60 Los términos "regulan" y "modulan" se utilizan indistintamente y, tal y como se usan en el presente documento, se

refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de una forma de A β seleccionada como diana). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula de interés. Actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular y transducción de señales.

En consecuencia, el término "modulador", tal y como se usa en esta memoria, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de una forma de A β seleccionada como diana). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, lo que disminuye la magnitud de al menos una actividad o una función de una molécula.

El término "agonista", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un aumento en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del agonista.

Los términos "antagonista" o "inhibidor", tal y como se utilizan en este documento, se refieren a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés provoca una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del antagonista. Antagonistas particulares de interés incluyen los que bloquean o modulan la actividad biológica de una forma de A β seleccionada como diana. Los antagonistas e inhibidores de una forma de A β seleccionada como diana pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas de unión de la invención que se unen al globulímero A β (20-42) y cualquier otra forma de A β seleccionada como diana. Un antagonista o inhibidor de una forma de A β seleccionada como diana puede reducir, por ejemplo, el efecto inhibidor de dicha forma de A β sobre la actividad de un canal de calcio presináptico regulado por voltaje de tipo P/Q.

Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o la duración de un trastorno o de uno o varios síntomas del mismo; impedir el avance de un trastorno; causar la regresión de un trastorno; evitar la recurrencia, el desarrollo, la aparición o la progresión de uno o varios síntomas asociados con un trastorno; detectar un trastorno; o aumentar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico).

El término "muestra", tal y como se usa en el presente documento, se emplea en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", tal y como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia procedente de un ser vivo o que anteriormente era un ser vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, líquido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

I. ANTICUERPOS DE LA INVENCION

Un primer aspecto particular de la invención proporciona anticuerpos que se unen al globulímero A β (20-42). De acuerdo con un aspecto particular, los anticuerpos son anticuerpos aislados. Según un aspecto particular adicional, los anticuerpos de la invención neutralizan una actividad del globulímero A β (20-42).

A. MÉTODO DE PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO A β (20-42)

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquiera entre una serie de métodos conocidos en la técnica.

1. ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GLOBULÓMERO A β (20-42) EMPLEANDO TECNOLOGÍA DE HIBRIDOMA

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y de visualización en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y que se describen, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.1988); Hammerling et al., en *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-587 (Elsevier, N.Y. 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene a partir de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago y no el método por el cual se produce.

Los métodos para producir y escrutar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. La presente descripción proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anti-

cuerpo de la invención, en donde, por ejemplo, el hibridoma se genera mediante la fusión de esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un antígeno descrito en este documento con células de mieloma y después seleccionando los hibridomas resultantes de la fusión, en busca de clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Brevemente, los ratones se pueden inmunizar con un antígeno de globulímero A β (20-42). En particular, el antígeno se puede administrar con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida mediante el secuestro en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador a secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si se está administrando un polipéptido, la pauta de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, que se desarrollan durante varias semanas.

Después de la inmunización de un animal con un antígeno de globulímero A β (20-42), los anticuerpos y/o las células productoras de anticuerpos se pueden obtener a partir del animal. Un suero que contiene anticuerpos anti-globulímero A β (20-42) se obtiene a partir del animal mediante sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede emplear tal y como se obtiene a partir del animal, una fracción de inmunoglobulina se puede obtener a partir del suero o los anticuerpos anti-globulímero A β (20-42) se pueden purificar a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de este modo son policlonales, teniendo así una serie heterogénea de propiedades.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos del antígeno globulímero A β (20-42) en el suero de ratón, se extirpa el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponibles en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante una dilución limitada. Los clones del hibridoma se someten entonces a ensayo por métodos conocidos en la técnica en busca de células que secretan anticuerpos capaces de unirse al globulímero A β (20-42). El fluido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, se puede generar mediante la inmunización de ratones con clones positivos para el hibridoma.

Los hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos se pueden preparar a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y los linfocitos B esplénicos se fusionan con células de mieloma inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane., *supra*). En particular, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulinas (una línea celular no secretora). Después de la fusión y la selección con antibiótico, los hibridomas se escrutan utilizando globulímero A β (20-42), o una porción del mismo, o una célula que expresa globulímero A β (20-42). En particular, el escrutinio inicial se puede llevar a cabo utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA). Un ejemplo de escrutinio con ELISA se proporciona en el documento WO 00/37504.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-globulímero A β (20-42) se seleccionan, se clonan y se escrutan adicionalmente en busca de características deseables, incluyendo un crecimiento fuerte del hibridoma, una producción elevada de anticuerpos y características de anticuerpos deseables, como se describe más adelante. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones sin pelo, o en un cultivo celular *in vitro*. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

En particular, los hibridomas pueden ser hibridomas de ratón, tal y como se han descrito anteriormente o se pueden producir en una especie no humana, no de ratón, tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos o pueden ser hibridomas humanos, en los que un mieloma humano no secretor se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-globulímero A β (20-42).

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

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GLOBULÍMERO A β (20-42) EMPLEANDO SLAM

Los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individuales, aislados utilizando un procedimiento denominado en la técnica el método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.627.052; en el documento de publicación PCT WO 92/02551; y Babcook J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843-7848. En este método, células individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos obtenidos a partir de uno cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección 1, se escrutan usando un ensayo de placa hemolítica específico de antígeno, en donde el antígeno globulímero A β (20-42) o una subunidad del mismo, se acopla a glóbulos rojos de oveja usando un enlazador, tal como biotina y se utiliza para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad para el globulímero A β (20-42). Después de la identificación de las células que secretan el anticuerpo de interés, los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera son rescatados de las células mediante PCR y transcriptasa inversa,

y estas regiones variables pueden expresarse entonces, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células hospedadoras de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células hospedadoras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, obtenidas a partir de linfocitos seleccionados *in vivo*, se pueden someter entonces a un análisis adicional y una selección *in vitro*, por ejemplo, mediante una clasificación de las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpos de globulímero A β (20-42). Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas se pueden manipular adicionalmente *in vitro*, tal como mediante métodos de maduración por afinidad *in vitro*, tales como los descritos en los documentos de publicación PCT WO 97/29131 y publicación PCT WO 00/56772.

3. ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GLOBULÓMERO A β (20-42) EMPLEANDO ANIMALES TRANSGÉNICOS

Los anticuerpos se pueden producir mediante la inmunización de un animal no humano que comprende algunos, o todos, los loci de la inmunoglobulina humana, con un antígeno de globulímero A β (20-42). En particular, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada genéticamente que comprende fragmentos grandes de los loci de la inmunoglobulina humana y no es capaz de producir anticuerpos de ratón. Véase, por ejemplo, Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994) y los documentos de Patente de EE.UU. 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364. Véanse también los documentos WO 91/10741, publicado el 25 de julio, 1991; WO 94/02602, publicado el 3 de febrero, 1994; WO 96/34096 y WO 96/33735, ambos publicados el 31 de octubre, 1996; WO 98/16654, publicado el 23 de abril, 1998; WO 98/24893, publicado el 11 de junio, 1998; WO 98150433, publicado el 12 de noviembre, 1998; WO 99/45031, publicado el 10 de septiembre, 1999; WO 99/53049, publicado el 21 de octubre, 1999; WO 00/09560, publicado el 24 de febrero, 2000; y WO 00/037504, publicado el 29 de junio, 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente un 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos de YAC con una configuración de línea germinal, con un tamaño de megabases, de los loci de la cadena pesada y x loci de la cadena ligera humana. Véase, Méndez et al., Nature Genetics, 15: 146-156 (1997); y Green y Jakobovits, J. Exp. Med., 188: 483-495 (1998).

4. ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GLOBULÓMERO A β (20-42) EMPLEANDO BANCOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Los métodos *in vitro* también se pueden emplear para preparar anticuerpos como se describen en este documento, en donde un banco de anticuerpos se escruta para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal escrutinio de bancos de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos, por ejemplo, en los documentos de Ladner et al., patente de EE.UU. n° 5.223.409; Kang et al., Publicación PCT n° WO92/18619; Dower et al., Publicación PCT n° WO91/17271; Winter et al., Publicación PCT n° WO92/20791; Markland et al., Publicación PCT n° WO92/15679; Breitling et al., Publicación PCT n° WO93/01288; McCafferty et al., Publicación PCT n° WO92/01047; Garrard et al., Publicación PCT n° WO92/09690; Fuchs et al., (1991) Bio/Technology, 9:1370-1372; Hay et al., (1992) Hum Antibod Hybridomas, 3:81-85; Huse et al., (1989) Science, 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature, (1990) 348:552-554; Griffiths et al., (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al., (1992) J Mol Biol, 226:889-896; Clackson et al., (1991) Nature, 352:624-628; Gram et al., (1992) PNAS, 89:3576-3580; Garrard et al., (1991) Bio/Technology, 9:1373-1377; Hoogenboom et al., (1991) Nucl Acid Res, 19:4133-4137; y Barbas et al., (1991) PNAS, 88:7.978-7982; Publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20030186374; y la Publicación PCT n° WO97/29131.

El banco de anticuerpos recombinantes puede proceder de un sujeto inmunizado con globulímero A β (20-42), o una porción de globulímero A β (20-42). Alternativamente, el banco de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto sin tratar, es decir, uno que no ha sido inmunizado con globulímero A β (20-42), tal como un banco de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con globulímero A β (20-42) humano. Los anticuerpos se seleccionan mediante el escrutinio del banco de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende globulímero A β (20-42) humano, para seleccionar de ese modo aquellos anticuerpos que reconocen el globulímero A β (20-42) y discriminan el globulímero A β (1-42), el monómero A β (1-40) y A β (1-42), las fibrillas A β y sAPP α . Los métodos para llevar a cabo tal escrutinio y selección son bien conocidos en la técnica, tal y como se describen en las referencias en el párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión particulares hacia el globulímero A β (20-42) y discriminan el globulímero A β (1-42), el monómero A β (1-40) y A β (1-42), las fibrillas A β y sAPP α , tales como los que se disocian del globulímero A β (20-42) humano con una constante de tasa k_{off} particular constante, se puede utilizar el método conocido en la técnica de transferencia de puntos para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de tasa k_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizante particular frente al globulímero A β (20-42) y discriminan el globulímero A β (1-42), el monómero A β (1-40) y A β (1-42), las fibrillas A β y sAPP α , tales como aquellos con una CI_{50} particular, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad del globulímero A β (20-42).

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une al globulímero A β (20-42) humano y discrimina el globulímero A β (1-42), el monómero A β (1-40) y A β (1-42), las fibrillas A β y sAPP α . De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos tal y como se describen en esta memoria, también se pueden generar utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan en la superficie de partículas de fagos que son portadores de las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En un particular, un fago de este tipo se puede utilizar para presentar dominios que se unen a antígeno expresados a partir de un repertorio o un banco de anticuerpos combinatorio (por ejemplo, humano o murino). Los fagos que expresan un dominio que se une a antígeno que se une al antígeno de interés, se pueden seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o una perla. Los fagos usados en esos métodos son normalmente fagos filamentosos que incluyen dominios que se unen a fd y M13 expresados a partir de un fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro, fusionados recombinantemente con la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención, incluyen los descritos en Brinkmann et al., J. Immunol. Methods, 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene, 1879-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology, 57:191-280 (1994); documentos de solicitud PCT n° PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; y patentes de EE.UU. n° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección en fagos, las regiones que codifican el anticuerpo procedentes del fago, se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento deseado que se une a antígeno y expresar en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques, 12(6):864-869 (1992); y Sawai et al., AJRI, 34:26-34 (1995); y Better et al., Science, 240:1041-1043 (1988). Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fvs y anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en los documentos de Patente de EE.UU. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., Methods in Enzymology, 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., Science, 240: 1038-1040 (1988).

Como alternativa al escrutinio de bancos de anticuerpos recombinantes mediante presentación en fagos, otras metodologías conocidas en la técnica para el escrutinio de grandes bancos combinatorios, se pueden aplicar para la identificación de anticuerpos con especificidad doble de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el que el banco de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteína, como se describe en el documento de Publicación PCT n° WO 98/31700 de Szostak y Roberts; y en Roberts R.W. y Szostak J.W., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que la codifica mediante una traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que son portadores de puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, un banco combinatorio) basándose en las propiedades del péptido o la proteína codificada, por ejemplo, un anticuerpo o una porción del mismo, de modo que se une el anticuerpo, o a una porción del mismo, con el antígeno de especificidad doble. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas con el escrutinio de tales bancos, pueden expresarse por medios recombinantes como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en células hospedadoras de mamífero) y, además, se pueden someter a una maduración por afinidad adicional mediante rondas adicionales de escrutinio de fusiones de ARNm-péptido, en las que se han introducido mutaciones en la o las secuencias seleccionadas originalmente, o por otros métodos para la maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente.

En otro enfoque, los anticuerpos tal y como se describen en este documento también se pueden generar usando métodos de presentación en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levadura, se utilizan métodos genéticos para ligar dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura y presentarlos sobre la superficie de la levadura. En particular, una levadura de este tipo se puede utilizar para presentar dominios que se unen a antígeno expresados a partir de un repertorio o un banco de anticuerpos combinatorio (por ejemplo, humano o murino). Ejemplos de métodos de presentación en levadura que se pueden utilizar para preparar los anticuerpos como se describen en este documento, incluyen los descritos por Wittrup et al. en el documento de Patente de EE.UU. n° 6.699.658.

B. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES PARA GLOBULÓMERO A β (20-42)

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir por cualquiera entre una serie de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión desde células hospedadoras, en donde el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" se entiende que incluyen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procarionotas o eucariotas. De acuerdo con un aspecto particular de la invención, la expresión de anticuerpos se realiza empleando células eucariotas, por ejemplo

células hospedadoras de mamífero, porque tales células eucariotas (y en particular las células de mamífero) son más propensas que las células procariotas a ensamblar y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo.

5 De acuerdo con un aspecto, las células hospedadoras de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable con DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufinan y P.A. Sharp, (1982) J. Mol Biol., 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de los anticuerpos en las células hospedadoras o la secreción de los anticuerpos en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse desde el medio de cultivo usando métodos convencionales de purificación de proteínas.

15 Las células hospedadoras también se pueden utilizar para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que son posibles variaciones sobre el procedimiento anterior. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para eliminar alguna parte, o todo, el ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligeras y pesadas que no es necesario para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos de la invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas de un antígeno distinto de los antígenos de interés, mediante reticulación de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos de reticulación química convencionales.

25 En un sistema particular para la expresión recombinante de un anticuerpo, o una porción del mismo que se une a un antígeno, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo, se introduce en células CHO dhfr- mediante transfección mediada con fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos están ligados funcionalmente cada uno con elementos reguladores de potenciador CMV/promotor AdMLP para impulsar niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también es portador de un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector, usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir una expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y se recupera un anticuerpo intacto desde el medio de cultivo. Se emplean técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo desde el medio de cultivo. Además, la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención mediante el cultivo de una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante desde el medio de cultivo.

1. ANTICUERPOS MURINOS ANTI-GLOBULÓMERO Aβ(20-42)

40 La Tabla 4 es una lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de 4D10 murino.

Tabla 4: LISTA DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE REGIONES VH Y VL

SEQ ID NO	REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SECUENCIA
		123456789012345678901234567890
23	m4D10_VH	<u>QVQLKQSGP</u> <u>SLIQPSQ</u> <u>LSITCTV</u> <u>SGFSLT</u> <u>SYGVHWVRQ</u> <u>SPGKLEW</u> <u>LGV IWRGGR</u> <u>IDYN</u> <u>AAFMSRLS</u> <u>ITKDNSK</u> <u>SQVFFKMN</u> <u>SLQADDT</u> <u>AIYYCARN</u> <u>SDVWGTG</u> <u>TTVTVSS</u>
24	m4D10_VL	<u>DVVMTQT</u> <u>PLTLSVT</u> <u>IGQPAS</u> <u>ISCKSSQ</u> <u>SLL</u> <u>DIDGKTY</u> <u>LNWLLQ</u> <u>RPQGSP</u> <u>KRLIYL</u> <u>VSKLD</u> <u>SGVPDR</u> <u>FRTGSG</u> <u>SGTDF</u> <u>TLKISR</u> <u>VEAED</u> <u>LG</u> <u>YYCWQ</u> <u>GTHFP</u> <u>YTFGG</u> <u>GTKLE</u> <u>IKR</u>

* Las CDRs están subrayadas en las cadenas ligeras y pesadas murinas.

2. ANTICUERPOS QUIMÉRICOS ANTI-GLOBULÓMERO Aβ(20-42)

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se obtienen a partir de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable obtenida a partir de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se describen en detalle en esta memoria. Véase, por ejemplo, Morrison, Science, 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques, 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods, 125:191-202; documentos de patentes de EE.UU. nº 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Además, se pueden emplear las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314:452-454, mediante genes de corte y empalme procedentes de una molécula de anticuerpo de ratón con especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

3. ANTICUERPOS CON INJERTOS DE CDR ANTI-GLOBULÓMERO Aβ(20-42)

Los anticuerpos injertados con CDRs comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano, en donde una o varias de las regiones CDR de VH y/o VL se sustituyen por secuencias de CDR de los anticuerpos murinos de la invención. Una secuencia de la región estructural de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo de una cadena lineal en una región estructural de este tipo conduce frecuentemente a alguna pérdida de afinidad de unión hacia el antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano con el anticuerpo murino original, hay menos probabilidad de que la combinación de las CDRs murinas con la región estructural humana introduzca distorsiones en las CDRs, lo que podría reducir la afinidad. Por lo tanto, la región estructural variable humana se puede elegir para que al reemplazar la región estructural variable murina aparte de las CDRs, tenga por ejemplo al menos una identidad de secuencia del 65% con la región estructural variable del anticuerpo murino. Las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDRs, tienen por ejemplo al menos un 70%, al menos un 75% de identidad de secuencia o al menos un 80% de identidad de secuencia. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se describen con detalle en este documento. (Véanse, también los documentos EP 239 400; Publicación PCT WO 91/09967; patentes de EE.UU. nº 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), para el recubrimiento o el revestimiento (documentos EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)), e intercambio al azar de cadenas (documento de Patente de EE.UU. nº 5.565.352).

La Tabla 5 a continuación ilustra las secuencias de anticuerpos con CDR injertadas de la presente invención (anticuerpos 4D10hum) y las CDRs contenidas en los mismos.

TABLA 5: LISTA DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE REGIONES VH y VL DE ANTICUERPOS CON INJERTOS DE CDR

SEQ ID NO	REGIÓN DE LA PROTEÍNA		SECUENCIA
			123456789012345678901234567890
4	4D10hum_VH.1z		<u>EVQLVESGGGLI</u> <u>QPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTV</u> <u>S</u> <u>SYGVHWVRQ</u> <u>APGKGLEWV</u> <u>SVIWRGGR</u> <u>IDYN</u> <u>AAFMSRFTI</u> <u>SRDNSKNT</u> <u>LYLQMN</u> <u>SLRAEDT</u> <u>AVYYCARN</u> <u>SDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSS</u>
8	4D10hum_VH.2z		<u>QVQLQESG</u> <u>PGLV</u> <u>KPSETL</u> <u>SLTCTV</u> <u>SGGSIS</u> <u>SYGVHWIR</u> <u>QPPGKLEW</u> <u>IGVIWRGGR</u> <u>IDYN</u> <u>AAFMSRVTI</u> <u>SVDT</u> <u>SKNQFSL</u> <u>KLSSV</u> <u>TAAADT</u> <u>AVYYCARN</u> <u>SDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSS</u>
17	VH 4D10hum CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NOS:4, 8	SYGVH
18	VH 4D10hum CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NOS: 4, 8	VIWRGGRIDYNAAFMS
19	VH 4D10hum CDR-H3	Residuos 98-101 de SEQ ID NOS: 4, 8	NSDV
12	4D10hum_Vk.1z		<u>DVVM</u> <u>TQSP</u> <u>LSL</u> <u>PVTL</u> <u>GQPAS</u> <u>ISCK</u> <u>SSQ</u> <u>SL</u> <u>DIDGKTY</u> <u>LNWFQ</u> <u>QRPGQ</u> <u>SPRRLI</u> <u>YLV</u> <u>SKLD</u> <u>SGVPDR</u> <u>FSGSG</u> <u>SGTDF</u> <u>TLKIS</u> <u>RVEA</u> <u>EDVGV</u> <u>YYC</u> <u>WQGT</u> <u>HFPY</u> <u>T</u> <u>FGQ</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>R</u>

20	VL 4D10hum CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO:12	KSSQSLLDIDGKTYLN
21	VL 4D10hum CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO:12	LVSKLDS
			123456789012345678901234567890
22	VL4D10hum CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO:12	WQGTHFPYT

* Las CDRs están subrayadas en las cadenas ligeras y pesadas humanizadas.

4. ANTICUERPOS HUMANIZADOS ANTI-GLOBULÓMERO Aβ(20-42)

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos obtenidas a partir de un anticuerpo de una especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o varias regiones determinantes de complementariedad (CDRs) procedentes de las especies no humanas y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana.

Las secuencias de Ig humanas conocidas se describen, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ /query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html; www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.mi-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu-blic/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.crysl.bbkc.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.crysl.bioc.cam.ac.uk/abo-ut.fmolina/Webpages/Pept/spotech.html; www.jerini.de/fr/roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Tales secuencias importadas se pueden emplear para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, la afinidad, la tasa de asociación, la tasa de disociación, la avidéz, la especificidad, la semivida o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los residuos estructurales en las regiones estructurales humanas pueden estar sustituidos por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión del antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de los residuos de las CDR y los estructurales para identificar residuos estructurales importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al., documento de Patente de EE.UU. nº 5.585.089; Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988)). Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son conocidos para por expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. Una inspección de estas presentaciones permite el análisis de la posible función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de consenso y de importación, de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad hacia el o los antígenos diana. En general, los residuos de CDR están implicados directa y más sustancialmente en influir en la unión al antígeno. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como, pero no limitados a los descritos en Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994); documentos de publicación PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592.106; EP 519.596, EP 239.400, Patentes de EE.UU. nº 5.565.332, 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539; 4.816.567.

ES 2 684 475 T3

La Tabla 6 a continuación ilustra las secuencias de anticuerpos humanizados de la presente descripción (anticuerpos 4D10hum) y las CDRs contenidas en los mismos.

TABLA 6: LISTA DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE REGIONES VH y VL DE ANTICUERPOS HUMANIZADOS

SEQ ID NO	REGIÓN DE LA PROTEÍNA		SECUENCIA
			123456789012345678901234567890
5	4D10hum_VH.1		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVS SYGVHWVRQAPGKGLEWVSVIWRGGRIDYN AAFMSRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDT AVYYCARNSDVWGQGT TTVTVSS
6	4D10hum_VH.1a		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLS SYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWRGGRIDYN AAFMSRLTISKDN SKSTVYLQMN SLRAEDT AVYYCARNSDVWGQGT TTVTVSS
7	4D10hum_VH.1b		EVQLVESGGGLI QPGGSLRLSCAASGFTLS SYGVHWVRQAPGKGLEWVSVIWRGGRIDYN AAFMSRFTISKDN SKNTLYLQMN SLRAEDT AVYYCARNSDVWGQGT TTVTVSS
9	4D10hum_VH.2		EVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGRIDYN AAFMSRVTSVDT SKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARNSDVWGQGT TTVTVSS
10	4D10hum_VH.2a		EVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGFSL S SYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWRGGRIDYN AAFMSRLTISKDT SKSQVSLKLSSVTAADT AVYYCARNSDVWGQGT TTVTVSS
			123456789012345678901234567890
11	4D10hum_VH.2b		EVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGFSL S SYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGRIDYN AAFMSRVTSKDT SKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARNSDVWGQGT TTVTVSS
17	VH 4D10hum CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NOs:5, 6, 7, 9, 10, 11	SYGVH
18	VH 4D10hum CDR-H2	Residuos 50-65 de SEQ ID NOs:5, 6, 7, 9, 10, 11	VIWRGGRIDYNAAFMS
19	VH 4D10hum CDR-H3	Residuos 98-101 de SEQ ID NOs:5, 6, 7, 9, 10, 11	NSDV
13	4D10hum_Vk.1		DVVM TQTPLSLPVT PGQPASISCKSSQSLL DIDGKTYLNWFLQKPGQSPQR LIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGT HFPYTFGQGT KLEIKR
14	4D10hum_Vk.1a		DVVM TQTPLSLPVT PGQPASISCKSSQSLL DIDGKTYLNWLLQKPGQSPQR LIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGT HFPYTFGQGT KLEIKR

15	4D10hum_Vk.1b		<u>DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSL</u> <u>L</u> <u>DIDGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYLVSKLD</u> <u>SGVPDRFSGSGSCTDFTLTKISRVEAEDVGV</u> <u>YYCWQGTHTFPYTFGQGTKLEIKR</u>
16	4D10hum_Vk.1c		<u>DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSL</u> <u>L</u> <u>DIDGKTYLNWFLQKPGQSPRRLIYLVSKLD</u> <u>SGVPDRFSGSGSCTDFTLTKISRVEAEDVGV</u> <u>YYCWQGTHTFPYTFGQGTKLEIKR</u>
			123456789012345678901234567890
20	VL 4D10hum CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NOs: 13,14,15,16	KSSQSLLDIDGKTYLN
21	VL 4D10hum CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NOs: 13,14,15,16	LVSKLDS
22	VL 4D10hum CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NOs: 13,14,15,16	WQGTHTFPYT
* Las CDRs están subrayadas en las cadenas ligeras y pesadas humanizadas.			

C. ANTICUERPOS Y LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS

De acuerdo con un aspecto, los anticuerpos anti-globulímero Aβ(20-42) de la presente invención o los anticuerpos contra cualquier otra forma de Aβ seleccionada como diana muestran una capacidad elevada para reducir o neutralizar la actividad del globulímero Aβ(20-42) (y/o cualquier otra forma de Aβ seleccionada como diana).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. De acuerdo con un aspecto, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 o una región constante de la cadena pesada de IgG4. De acuerdo con otro aspecto, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera, o bien una región constante de la cadena ligera kappa o una región constante de la cadena ligera lambda. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera kappa. Una porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

Los reemplazamientos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar una función efectora de anticuerpos son conocidos en la técnica (Winter et al., documentos de Patente de EE.UU. nº 5.648.260 y 5.624.821). La porción Fc de un anticuerpo es mediadora en varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y semivida/tasa de aclaramiento del anticuerpo y de complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para un anticuerpo terapéutico, pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de las dianas terapéuticas. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, son mediadores en ADCC y CDC mediante la unión a FcγRs y C1q del complemento, respectivamente. Los receptores de Fc neonatal (FcRn) son los componentes decisivos que determinan la semivida circulante de los anticuerpos. En todavía otra realización, al menos un residuo de aminoácido se sustituye en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

Una realización proporciona un anticuerpo marcado en donde un anticuerpo de la invención se derivatiza o se une a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, un anticuerpo marcado de la invención se puede obtener mediante el enlace funcional de un anticuerpo de la invención (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) con una o varias entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo con otra molécula (tal como una región del núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que se puede derivatizar un anticuerpo de la invención, incluyen compuestos fluorescentes. Agentes detectables ejemplares fluorescentes incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también se puede derivatizar con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado que es detectable. Un anticuerpo también se puede derivatizar con biotina y detectarse a través de una medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

Otra realización de la invención proporciona un anticuerpo cristalizado. De acuerdo con un aspecto, la invención se

refiere a cristales de anticuerpos anti-globulímero A β (20-42) completos y a fragmentos de los mismos como se describe en esta memoria, y a formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. De acuerdo con otro aspecto, el anticuerpo cristalizado tiene una mayor semivida *in vivo* que el homólogo soluble del anticuerpo. De acuerdo con otro aspecto, el anticuerpo conserva la actividad biológica después de la cristalización.

- 5 Un anticuerpo cristalizado de la invención se puede producir según métodos conocidos en la técnica y como se describe en el documento WO02/072636.

Otra realización de la invención proporciona un anticuerpo glicosilado, en donde el anticuerpo comprende uno o varios residuos de carbohidrato. La producción de proteína naciente *in vivo* puede someterse a un procesamiento adicional, conocido como modificación postraducciona. En particular, se pueden añadir enzimáticamente residuos de azúcar (glicosilo), un procedimiento conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que son portadoras de cadenas laterales de oligosacáridos unidos covalentemente, se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas.

Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o varios residuos de carbohidrato en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los residuos de carbohidrato en el dominio Fc tienen un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo sobre la unión al antígeno o la semivida del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.*, 21 (2005), pp. 11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de la unión del anticuerpo, probablemente debido a un impedimento estérico (Co, M.S., et al., *Mol. Immunol.*, (1993) 30:1361-1367), o producir una mayor afinidad hacia el antígeno (Wallick, S.C., et al., *Exp. Med.*, (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., *EMBO J.*, (1991) 10:2717-2723).

Un aspecto de la presente invención se dirige a la generación de mutantes del sitio de glicosilación, en donde se ha mutado el sitio de glicosilación ligado a O o a N del anticuerpo. Un experto en la técnica puede generar tales mutantes usando tecnologías convencionales bien conocidas. La creación de mutantes del sitio de glicosilación que conservan la actividad biológica pero que han aumentado o disminuido la actividad de unión, son otro objeto de la presente invención.

En todavía otra realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo de la invención. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo no glicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, mediante una alteración de uno o varios de los sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o varias sustituciones de aminoácidos que dan lugar a la eliminación de uno o varios sitios de glicosilación de la región variable, para eliminar de ese modo una glicosilación en ese sitio. Tal glicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe con más detalle en el documento de publicación de solicitud internacional n° WO03/016466A2 y las patentes de EE.UU. n° 5.714.350 y 6.350.861.

Adicional o alternativamente, un anticuerpo modificado de la invención se puede preparar de modo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tiene incrementadas las estructuras bisectrices de GlcNAc. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con una maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células hospedadoras en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con la glicosilación alterada. Véase, por ejemplo Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1), así como los documentos de Publicación europea n° EP 1.176.195; Publicación de solicitud internacional n° WO03/035835 y WO99/5434280.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula hospedadora en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas) y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteínas y la composición de los residuos de glicosilo, pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se expresa la proteína particular. Residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no están limitados a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo glicosilado comprende residuos de glicosilo, de tal manera que el patrón de glicosilación es humano.

Es conocido por los expertos en la técnica que una glicosilación diferente de las proteínas puede dar como resultado diferentes características proteicas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo hospedador, tal como levadura, y glicosilada utilizando la ruta endógena de la levadura, se puede reducir en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunógenas en los seres humanos y muestran una reducción de la semivida *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en los seres humanos y otros animales pueden reconocer residuos de glicosilo específicos y favorecer el aclaramiento rápido de la proteína desde la sangre. Otros

efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de la proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad o alergenicidad. Por consiguiente, un profesional en la técnica puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición y un patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, al producido en las células humanas o en las células específicas de especie, del animal objeto deseado.

El que las proteínas glicosiladas se expresen de forma diferente a la de una célula hospedadora, se puede conseguir modificando genéticamente la célula hospedadora para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Utilizando métodos conocidos en la técnica, un profesional puede generar anticuerpos que muestran una glicosilación de las proteínas humana. Por ejemplo, se han modificado genéticamente cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación de origen no natural, de modo que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en esas cepas de levadura muestran una glicosilación de las proteínas que es idéntica a la de las células animales, especialmente células humanas (documentos de Publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20040018590 y 20020137134; y WO05/100584).

Además, se describen en este documento anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) específicos para tales anticuerpos de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo, que reconoce determinantes únicos, generalmente asociados con la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar mediante la inmunización de un animal con el anticuerpo o una región que contiene CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en todavía otro animal, produciendo un anticuerpo denominado anti-anti-Id.

Además, un experto en la técnica apreciará que una proteína de interés se puede expresar utilizando un banco de células hospedadoras manipuladas genéticamente para expresar diversas enzimas de glicosilación, de tal manera que las células hospedadoras miembros del banco producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un profesional en la técnica puede entonces seleccionar y aislar la proteína de interés con determinados patrones de glicosilación novedosos. De acuerdo con otro aspecto, la proteína que tiene un patrón de glicosilación novedoso seleccionado particularmente, muestra propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

D. USOS DE ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO A β (20-42)

Teniendo en cuenta su capacidad para unirse al globulómero A β (20-42), los anticuerpos anti-globulómero A β (20-42) o anticuerpos contra otra forma de A β seleccionada como diana, de la invención se pueden usar para detectar el globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero, CSF, tejido cerebral o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejidos. La descripción proporciona un método para detectar globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo de la invención y detectar ya sea el anticuerpo unido a globulómero A β (20-42) (y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana) o anticuerpo no unido, para detectar de ese modo globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluye ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho o ^{153}Sm .

De forma alternativa al marcado del anticuerpo, el globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana se pueden someter a ensayo en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia utilizando patrones de globulómero A β (20-42) marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo de globulómero A β (20-42) sin marcar. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de globulómero A β (20-42) marcados y el anticuerpo anti-globulómero A β (20-42) se combinan y se determina la cantidad de patrón de globulómero A β (20-42) marcado unido al anticuerpo sin marcar. La cantidad de globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de globulómero A β (20-42) marcado unido al anticuerpo anti-globulómero A β (20-42).

De acuerdo con un aspecto de la invención, los anticuerpos de la invención son capaces de neutralizar la actividad de globulómero A β (20-42) y/o la actividad de cualquier otra forma de A β seleccionada como diana, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, tales anticuerpos de la invención, pueden usarse para inhibir (es decir, reducir) la actividad del globulómero A β (20-42) y/o la actividad de cualquier otra forma de A β seleccionada como diana, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma

de A β seleccionada como diana, con los que un anticuerpo de la invención reacciona de forma cruzada. En una realización, la invención proporciona un método para inhibir (es decir, reducir) la actividad de globulómero A β (20-42) y/o la actividad de cualquier otra forma de A β seleccionada como diana, que comprende poner en contacto el globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana con un anticuerpo de la invención, de modo que se inhibe (es decir, se reduce) la actividad de globulómero A β (20-42) y/o la actividad de cualquier otra forma de A β seleccionada como diana. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene, globulómero A β (20-42) y/o cualquier otra forma de A β seleccionada como diana, un anticuerpo de la invención se puede añadir al medio de cultivo para inhibir (es decir, reducir) la actividad de globulómero A β (20-42) y/o la actividad de cualquier otra forma de A β seleccionada como diana en el cultivo.

Además, la descripción proporciona un método para inhibir (es decir, reducir) la actividad de una forma de A β seleccionada como diana en un sujeto, ventajosamente en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno en el que la actividad de dicha forma de A β es perjudicial, o una enfermedad o un trastorno que se selecciona a partir del grupo que consiste en carencia de alfa-1-antitripsina, angioedema por carencia de inhibidor de C1, enfermedad tromboembólica por carencia de antitrombina, Kuru, enfermedad de Creutzfeld-Jacob/tembladera, encefalopatía espongiforme bovina, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, insomnio familiar fatal, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa, atrofia de Machado-Joseph, atrofia Dentato-rubro-palidoluisiana, demencia frontotemporal, anemia de células falciformes, hemólisis de cuerpo de inclusión de hemoglobina inestable, hemólisis de cuerpo de inclusión inducida por fármacos, enfermedad de Parkinson, amiloidosis AL sistémica, amiloidosis AL nodular, amiloidosis AA sistémica, amiloidosis prostática, amiloidosis por hemodiálisis, angiopatía cerebral hereditaria (islandesa), enfermedad de Huntington, amiloidosis visceral familiar, polineuropatía visceral familiar, amiloidosis visceral familiar, amiloidosis sistémica senil, neuropatía amiloide familiar, amiloidosis cardíaca familiar, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, tiroides con carcinoma medular y diabetes mellitus de tipo 2 (TDM2).

La descripción proporciona métodos para inhibir (es decir, reducir) la actividad de una forma de A β seleccionada como diana en un sujeto que padece tal enfermedad o trastorno, cuyo método comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención, de modo que la actividad de dicha forma de A β en el sujeto se inhibe (es decir, se reduce). En un ejemplo de tal método, dicha forma de A β seleccionada como diana es una forma de A β humana y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa APP o cualquier forma de A β que da lugar a la generación de una forma de A β seleccionada como diana a la que se puede unir un anticuerpo de la invención. Todavía adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero no humano en el que se ha introducido una forma de A β seleccionada como diana (por ejemplo, mediante la administración de la forma de A β seleccionada como diana o mediante la expresión de APP o cualquier otra forma de A β que da lugar a la generación de la forma de A β seleccionada como diana). Un anticuerpo de la invención se puede administrar a un sujeto humano con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención se puede administrar a un mamífero no humano en el que la expresión de APP o cualquier forma de A β da como resultado la generación de una forma de A β seleccionada como diana con la que el anticuerpo es capaz de unirse con fines veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Sobre esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo analizando las dosificaciones y cursos de tiempo de la administración).

Además se describe en este documento un método para inhibir (es decir, reducir) la actividad de una forma de A β seleccionada como diana en un sujeto que padece una amiloidosis, tal como la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Down.

Un trastorno en el que la actividad de una forma de A β seleccionada como diana es perjudicial, incluye enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de una forma de A β seleccionada como diana en un sujeto que padece el trastorno, ha mostrado ser o es sospechosa de ser responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de una forma de A β seleccionada como diana es perjudicial, es un trastorno en el que la inhibición (es decir, la reducción) de la actividad de dicha forma de A β se espera que alivie algunos o todos los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales trastornos se pueden evidenciar, por ejemplo, por un aumento en la concentración de una forma de A β seleccionada como diana en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de la forma de A β seleccionada como diana en el suero, tejido cerebral, plasma, líquido cefalorraquídeo, etc. del sujeto), que se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-globulómero A β (20-42) y/o un anticuerpo contra cualquier otra forma de A β seleccionada como diana como se ha descrito anteriormente, o cualquier anticuerpo para cualquier forma de A β que comprende el epitopo del globulómero con el que reaccionan los anticuerpos de la presente invención. Ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la invención, incluyen aquellos trastornos descritos en este documento y los descritos en la sección más abajo perteneciente a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

En todavía otra realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en un método para evitar la progresión (por ejemplo, el empeoramiento) de un estado de enfermedad descrito en este documento. El método comprende la administración al sujeto que requiere un tratamiento (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las proteínas de unión o anticuerpos como se describen en este documento. Alternativamente, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las proteínas tal y como se describen en este documento, en combinación con

una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico.

En los métodos descritos anteriormente para la prevención del desarrollo o la progresión de un trastorno descrito en la presente memoria, uno o varios biomarcadores, pruebas diagnósticas o una combinación de biomarcadores y pruebas diagnósticas conocidas por los expertos de la técnica, se pueden usar para determinar si (1) un sujeto tiene riesgo o no de desarrollar uno o varios de los trastornos descritos en el presente documento; o si (2) los trastornos descritos en el presente documento en el sujeto diagnosticado previamente con uno o varios de los trastornos mencionados anteriormente, está progresando (por ejemplo, empeorando).

Uno o varios biomarcadores, pruebas diagnóstico o combinaciones de biomarcadores y pruebas de diagnóstico conocidas en la técnica se pueden usar para identificar sujetos que tienen riesgo de desarrollar un trastorno descrito en la presente memoria. Del mismo modo, uno o varios biomarcadores, pruebas de diagnóstico o combinaciones de biomarcadores y pruebas de diagnóstico conocidas en la técnica se pueden usar para determinar la progresión de la enfermedad o la afección de sujetos en los que se ha identificado que padecen un trastorno descrito en la presente memoria. Por ejemplo, uno o varios marcadores biológicos, marcadores formadores de neuroimágenes o una combinación de marcadores biológicos o formadores de neuroimágenes (por ejemplo, MRI, etc.) se pueden utilizar para identificar sujetos que tienen riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o, para aquellos sujetos en los que se ha identificado que padecen la enfermedad de Alzheimer, la progresión de la enfermedad. Los marcadores biológicos que se pueden examinar incluyen pero sin estar limitados a, beta-amiloide₁₋₄₂, tau, tau fosforilada (ptau), anticuerpos de A β plasmática, α -antiquimotripsina, proteína precursora de amiloide, la relación de la isoforma de la proteína precursora amiloide, APP, en plaquetas, β -secretasa (también conocida como BACE), CD59, 8-hidroxidesoxiguanina, glutamina sintetasa, proteína ácida glial fibrilar (GFAP), anticuerpos contra GFAP, complejo de interleucina-6-receptor, calcitreína, melanotransferrina, proteínas de neurofilamentos, nitrotirosina, oxiesteroles, sulfátidos, marcadores sinápticos, S100 β , NPS, proteínas de señalización plasmáticas, etc., o cualquier combinación de los mismos (véase, Shaw, L., et al., Nature Reviews 2007, 6, 295-303. Borroni, B., et al., Current Med. Chem. 2007, 14, 1171-1178. Phillips, K., et al., Nature Reviews 2006, 5 463-469. Bouwman, F.H., et al., Neurology 2007, 69, 1006-1011; Ray, S., et al., Nature Medicine 2007, 13(11) 1359-1362. Cummings, J., et al., Neurology, 2007, 69, 1622-1634).

E. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención son para uso, pero sin limitación, en el diagnóstico, la detección o el seguimiento de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de un trastorno o uno o varios síntomas del mismo, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o varios anticuerpos de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o varios anticuerpos de la invención y uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención, para el tratamiento de un trastorno en el que la actividad de una forma de A β seleccionada como diana es perjudicial. En una realización adicional, los agentes profilácticos o terapéuticos son conocidos por ser útiles o porque se han utilizado o se emplean actualmente en la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de un trastorno o uno o varios síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender, además un vehículo, un diluyente o un excipiente.

Los anticuerpos de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Normalmente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal y como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o varios entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia del anticuerpo.

En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno tal y como se ha descrito en este documento.

Se conocen varios sistemas de entrega y se pueden utilizar para administrar uno o varios anticuerpos de la invención o la combinación de uno o varios anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o un agente terapéutico útil para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno o uno o varios síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración en la mucosa (por ejemplo, rutas intranasales y orales).

Además, la administración pulmonar se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n° 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y de Publicación PCT n° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización, un anticuerpo de la invención, una terapia de combinación o una composición de la invención se administra usando tecnología de administración de fármacos por vía pulmonar Alkermes AIR[®] (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos de la invención de forma local en un área que requiere un tratamiento; esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local, inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, que incluye membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel[®]) o matrices de colágeno. En una realización, una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de la invención se administra localmente en la zona afectada a un sujeto para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de la invención se administra localmente a un sujeto en la zona afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o varias terapias (por ejemplo, uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar un trastorno o uno o varios de sus síntomas.

En otra realización, el anticuerpo se puede entregar en un sistema de liberación controlada o sostenida. En una realización, se puede emplear una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase, Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery, 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med., 321:574). En otra realización, se pueden emplear materiales poliméricos para lograr una liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (ed), CRC Pres., Boca Ratón, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (ed), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); documentos de Patente de EE.UU. n° 5.679.377; Patente de EE.UU. n° 5.916.597; Patente de EE.UU. n° 5.912.015; Patente de EE.UU. n° 5.989.463; Patente de EE.UU. n° 5.128.326; Publicación PCT n° WO99/15154; y publicación PCT n° WO99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una realización particular, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, exento de impurezas lixiviables, estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable. En aún otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede situar en la proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, Science, 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica se puede utilizar para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o varios anticuerpos de la invención. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n° 4.526.938, de Publicación PCT WO 91/05548, Publicación PCT WO 96/20698; Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

Cuando la composición es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para favorecer la expresión de su anticuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retrovírico (véase, el documento de Patente de EE.UU. n° 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, DuPont) o recuperándolo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo junto con un péptido similar a una homeobox que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de una célula hospedadora para una expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica),

transmucosal y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para una administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Normalmente, las composiciones para una administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención se van a administrar por vía tópica, las composiciones se pueden formular en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, espray, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa (1995). Para las formas de dosificación no pulverizables tópicas, se emplean normalmente formas de viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o varios excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y similares, que, si se desea, se esterilizan o mezclan con agentes auxiliares (por ejemplo, agentes conservantes, estabilizantes, humectantes, tampones o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, preferiblemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un agente volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en una botella presionable. Agentes hidratantes o humectantes también se pueden añadir a composiciones farmacéuticas y formas de dosificación, si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de tratamiento comprende una administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en una forma de aerosol, espray, pulverización o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método de tratamiento comprende una administración oral, las composiciones se pueden formular por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones y similares. Los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de, pero no limitadas a, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponadas, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para una liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de tratamiento puede comprender una administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, de una composición formulada con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n.º 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540 y 4.880.078; y de Publicación PCT n.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización específica, un anticuerpo de la invención, una terapia de combinación y/o una composición de la invención se administra utilizando la tecnología de administración de fármacos por vía pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de tratamiento puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden presentar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituirlo con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos) antes del uso. Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente una administración de composiciones formuladas

como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales polímeros o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Los métodos de tratamiento incluyen la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como las obtenidas a partir de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con cationes tales como las obtenidas a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o una bolsita, indicando la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es una infusión, la composición se puede administrar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando el modo de administración es mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En particular, la invención también proporciona que uno o varios de los anticuerpos, o las composiciones farmacéuticas de la invención se envasan en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o un sobre, indicando la cantidad del anticuerpo. En una realización, uno o varios de los anticuerpos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se suministra como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado y se puede reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) hasta la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En una realización, uno o varios de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención, se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado con una dosificación unitaria de al menos 5 mg, por ejemplo, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los anticuerpos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse a entre 2°C y 8°C en su envase original y los anticuerpos, o las composiciones farmacéuticas de la invención deben administrarse 1 semana, preferiblemente 5 días, 72 horas, 48 horas, 24 horas, 12 horas, 6 horas, 5 horas, 3 horas o 1 hora después de haber sido reconstituidos. En una realización alternativa, uno o varios de los anticuerpos o las composiciones farmacéuticas de la invención, se suministra en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado que indica la cantidad y la concentración del anticuerpo. En una realización adicional, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado de al menos 0,25 mg/ml, por ejemplo, al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse entre 2°C y 8°C en su envase original.

Los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. En un aspecto, los anticuerpos se prepararán como una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por cualquier forma de dosificación líquida o liofilizada en un frasco incoloro o de color ámbar, una ampolla o una jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a un pH de 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. El cloruro de sodio puede usarse para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sacarosa (de manera óptima 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de carga para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (de manera óptima 2-4%). Se pueden utilizar estabilizadores tanto en las formas de dosificación líquidas como liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (de manera óptima 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen glicina, arginina, y pueden incluirse como 0-0,05% de polisorbato-80 (de manera óptima 0,005-0,01%). Los tensioactivos adicionales incluyen pero no se limitan a polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención, preparada como una solución inyectable para administración parenteral, puede comprender además un agente útil como adyuvante, tal como los que se utilizan para aumentar la absorción o dispersión del anticuerpo. Un adyuvante particularmente útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de una administración parenteral, particularmente una administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de la inyección (es decir, mayores de 1 ml) con menos dolor y malestar y una incidencia mínima de reacciones en el sitio de la inyección. (Véase, el documento de Publicación de solicitud internacional nº WO 04/078140 y Publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2006104968).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquida, semisólida y sólida, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones pueden estar en

forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. En una realización, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

5 Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (es decir, una proteína de unión, p. ej., un anticuerpo, de la presente invención) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles, liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación comprenden el secado al vacío y el secado por pulverización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado procedente de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Una absorción prolongada de composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

20 Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar a través de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferida es la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden emplear polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

30 En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El anticuerpo (y otros ingredientes, si se desea) también pueden estar incluidos en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, prensados en comprimidos o incorporados directamente en la dieta del sujeto. Para una administración terapéutica oral, el anticuerpo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un anticuerpo de la invención mediante una vía de administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el anticuerpo o coadministrarlo con un material para evitar su inactivación.

40 Compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se formula conjuntamente y/o se coadministra con uno o varios agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos o enfermedades descritos en este documento. Por ejemplo, un anticuerpo anti-globulímero A β (20-42) de la invención puede coformularse y/o coadministrarse con uno o varios anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otros antígenos solubles o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, uno o varios anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

50 En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención está unido a un vehículo conocido en la técnica que extiende la semivida. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en el documento de patente de EE.UU. n° 6.660.843 y publicado en la solicitud PCT n° WO 99/25044.

Las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención, se pueden administrar para tratar, prevenir, gestionar o mejorar un trastorno o uno o varios síntomas del mismo a través de una terapia génica. La terapia génica se refiere a una terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En este caso, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado de la invención que media en un efecto profiláctico o terapéutico.

60 Se puede emplear cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase, Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11 (5):155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN

recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel et al. (ed), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). Una descripción detallada de los diversos métodos de terapia génica se describe en el documento US20050042664 A1.

5 Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación para tratar enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, demencia, enfermedad de Parkinson o cualquier otra enfermedad o afección asociada con una acumulación de proteína beta amiloide en el cerebro. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar "enfermedades conformacionales". Tales enfermedades surgen de cambios
10 estructurales de secundarios a terciarios con proteínas constituyentes con una agregación posterior de las proteínas alteradas (Hayden et al., JOP. J Pancreas 2005; 6(4): 287-302). En particular, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar una o varias de las siguientes enfermedades conformacionales: carencia de alfa-1-antitripsina, angioedema por carencia de inhibidor de C1, enfermedad tromboembólica por carencia de antitrombina, Kuru, enfermedad de Creutzfeld-Jacob/tembladera, encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de Gerstmann-
15 Straussler-Scheinker, insomnio familiar fatal, enfermedad de Huntington, ataxia espinoocerebelosa, atrofia de Machado-Joseph, atrofia Dentato-rubro-palidoluisiana, demencia frontotemporal, anemia de células falciformes, hemólisis de cuerpo de inclusión de hemoglobina inestable, hemólisis de cuerpo de inclusión inducida por fármacos, enfermedad de Parkinson, amiloidosis AL sistémica, amiloidosis AL nodular, amiloidosis AA sistémica, amiloidosis prostática, amiloidosis por hemodiálisis, angiopatía cerebral hereditaria (islandesa), enfermedad de Huntington, amiloidosis visceral familiar, polineuropatía visceral familiar, amiloidosis visceral familiar, amiloidosis sistémica senil, neuropatía amiloide familiar, amiloidosis cardíaca familiar, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, tiroides con carcinoma medular y diabetes mellitus de tipo 2 (TDM2). Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para tratar una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down.

Debe entenderse que los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o en combinación con uno o varios agentes adicionales, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, una molécula pequeña o biológica), dicho agente
25 adicional es seleccionado por el experto en la materia para su finalidad prevista. Por ejemplo, el agente terapéutico adicional puede ser un "fármaco potenciador cognitivo", que es un fármaco que mejora capacidades cognitivas humanas deterioradas del cerebro (es decir, pensamiento, aprendizaje y memoria). Los fármacos potenciadores cognitivos actúan mediante una alteración de la disponibilidad de los agentes neuroquímicos (por ejemplo, neurotransmisores, enzimas y hormonas), mediante la mejora del suministro de oxígeno, mediante la estimulación del crecimiento nervioso o mediante la inhibición del daño a los nervios. Ejemplos de fármacos potenciadores cognitivos incluyen un compuesto que aumenta la actividad de la acetilcolina tal como, pero no limitado a, un agonista del receptor de acetilcolina (por ejemplo, un agonista del receptor nicotínico α -7 o un modulador alostérico, un agonista del receptor nicotínico α 4 β 2 o moduladores alostéricos), un inhibidor de la acetilcolinesterasa (p. ej., donepezil, rivastigmina y galantamina), un inhibidor de butirilcolinesterasa, un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (p. ej., memantina), un agonista de la proteína neuroprotectora dependiente de actividad (ADNP), un agonista del receptor de serotonina 5-HT_{1A} (p. ej., xaliproden), un agonista del receptor de 5-HT₄, un antagonista del receptor de 5-HT₆, un antagonista del receptor de serotonina 1A, un antagonista del receptor de histamina H₃, un inhibidor de calpaína, una proteína o agonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor de crecimiento trófico, un compuesto anti-apoptótico, un activador del receptor de glutamato de tipo AMPA, un bloqueador o modulador del canal de calcio de tipo L o de tipo N, un bloqueador del canal de potasio, un activador del factor inducible por hipoxia (HIF), un inhibidor de la prolil-4-hidroxilasa de HIF, un agente anti-inflamatorio, un inhibidor del péptido A β o de la placa amiloide, un inhibidor de la hiperfosforilación de tau, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (p. ej., tadalafil, sildenafil), un inhibidor de la fosfodiesterasa 4, un inhibidor de la monoamina oxidasa, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Ejemplos específicos de tales fármacos potenciadores cognitivos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la colinesterasa tales como donepezil (Aricept[®]), rivastigmina (Exelon[®]), galantamina (Reminyl[®]), antagonistas de N-metil-D-aspartato tales como memantina (Namenda[®]). Al menos un fármaco potenciador cognitivo se puede administrar simultáneamente con los anticuerpos de la presente invención o secuencialmente con los anticuerpos de la presente invención (y en cualquier orden), incluyendo aquellos agentes actualmente reconocidos o que se reconocerán en un futuro, por ser útiles para tratar la enfermedad o la afección que se está tratando con un anticuerpo de la presente invención). Además, se cree que las combinaciones descritas en este documento pueden tener efectos aditivos o sinérgicos cuando se usan en el tratamiento anteriormente descrito. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

Debe entenderse además que las combinaciones que se van a incluir dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para su fin previsto. Los agentes que se exponen a continuación son ilustrativos para los fines y no pretenden limitar. Las combinaciones, que forman parte de esta invención, pueden comprender un anticuerpo de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado a partir de las listas más abajo. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

60 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede ser determinada por una persona experta

en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo se supera por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, ya que se emplea una dosis profiláctica en los sujetos antes o durante una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, un único bolo se puede administrar, varias dosis divididas se pueden administrar a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal y como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitarias de la invención están dictadas y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico o profiláctico particular que se va a alcanzar y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formulación de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitativo, ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo de la invención es 0,1-20 mg/kg, por ejemplo, 1-10 mg/kg. Se debe tener en cuenta que los valores de la dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se va a aliviar. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son únicamente a modo de ejemplo y no están destinados a limitar el alcance o la puesta en práctica de la composición reivindicada.

Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen con fines ilustrativos solamente y no se pretende que sean limitativos de la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE GLOBULÓMEROS

a) Globulómero A β (1-42):

El péptido A β (1-42) sintético (H-1368, Bachem, Bubendorf, Suiza) se suspendió en 100% de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a 6 mg/ml y se incubó hasta una solubilización completa bajo agitación a 37°C durante 1,5 h. HFIP actúa como un disociador de enlaces de hidrógeno y se utiliza para eliminar las no homogeneidades estructurales preexistentes en el péptido A β . HFIP se retiró por evaporación en un SpeedVac y A β (1-42) se resuspendió a una concentración de 5 mM en dimetilsulfóxido y se sometió a ultrasonidos durante 20 s. El A β (1-42) pretratado con HFIP se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) hasta 400 μ M y se añadió 1/10 del volumen de 2% de dodecilsulfato de sodio (SDS) (en H₂O) (concentración final de 0,2% de SDS). Una incubación durante 6 horas a 37°C dio lugar al producto intermedio de globulómero A β (1-42) de 16/20-kDa (forma corta para el oligómero globular). El globulómero A β (1-42) de 38/48-kDa se generó mediante una dilución adicional con tres volúmenes de H₂O e incubación durante 18 horas a 37°C. Después de la centrifugación a 3000 g durante 20 min, la muestra se concentró por ultrafiltración (corte de 30-kDa), se dializó frente a NaH₂PO₄ 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, se centrifugó a 10.000 g durante 10 min y se retiró el material sobrenadante que comprendía el globulómero A β (1-42) de 38/48-kDa. Como una alternativa a la diálisis, el globulómero A β (1-42) de 38/48-kDa también podía precipitar con un exceso de nueve veces (v/v) de solución enfriada con hielo de metanol/ácido acético (33% de metanol, 4% de ácido acético) durante 1 hora a 4°C. Se sedimentó después el globulómero A β (1-42) de 38/4-kDa (10 min a 16200 g), se resuspendió en NaH₂PO₄ 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4 y el pH se ajustó a 7,4.

b) Globulómero A β (20-42):

Se mezclaron por adición 1,59 ml de la preparación de globulómero A β (1-42) preparada según el Ejemplo 1, con 38 ml de tampón (MES/NaOH 50 mM, pH 7,4) y 200 μ l de una solución de 1 ml/ml de termolisina (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 20 h. Después, se añadieron 80 μ l de una solución de EDTA 100 mM, pH 7,4, en agua y la mezcla se ajustó adicionalmente a un contenido en SDS de 0,01% con 400 μ l de una solución rigurosa de SDS al 1%. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente 1 ml a través de un tubo Centriprep de 15 ml de 30 kDa. El material concentrado se mezcló por adición con 9 ml de tampón (MES/NaOH 50 mM, 0,02% de SDS, pH 7,4) y se concentró de nuevo hasta 1 ml. El material concentrado se dializó a 6°C frente a 1 l de tampón (fosfato de sodio 5 mM, NaCl 35 mM) en un tubo de diálisis durante 16 h. El material dializado se ajustó a un contenido en SDS de 0,1% con una solución rigurosa de SDS al 2% en agua. La mezcla se centrifugó a 10.000 g

durante 10 min y se retiró el material sobrenadante de globulómero A β (20-42).

c) Globulómero A β (12-42):

Se mezcló por adición una preparación de 2 ml de globulómero A β (1-42) preparado según el Ejemplo 1a con 38 ml de tampón (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 35 mM, pH 7,4) y 150 μ l de 1 mg/ml de endoproteinasa GluC (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 6 h a TA y se añadieron después otros 150 μ l de un 1 mg/ml de endoproteinasa GluC (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó a TA durante otras 16 h, seguido de la adición de 8 μ l de una solución de DIFP 5 M. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente 1 ml a través de un tubo Centriprep de 15 ml de 30 kDa. El material concentrado se mezcló por adición con 9 ml de tampón (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 35 mM, pH 7,4) y se concentró de nuevo hasta 1 ml. El material concentrado se dializó a 6°C frente a 1 l de tampón (fosfato de sodio 5 mM, NaCl 35 mM) en un tubo de diálisis durante 16 h. El material dializado se ajustó a un contenido en SDS de 0,1% con una solución rigurosa de SDS al 1% en agua. La mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 10 min y se retiró el material sobrenadante de globulómero A β (12-42).

d) Globulómero A β (1-42) reticulado:

El péptido A β (1-42) sintético (H-1368, Bachem, Bubendorf, Suiza) se suspendió en 100% de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a 6 mg/ml y se incubó hasta una solubilización completa con agitación a 37°C durante 1,5 h. El HFIP actúa como un disociador de enlaces de hidrógeno y se utilizó para eliminar las no homogeneidades estructurales preexistentes en el péptido A β . HFIP se retiró por evaporación en un SpeedVac y el globulómero A β (1-42) se resuspendió a una concentración de 5 mM en dimetilsulfóxido y se sometió a ultrasonidos durante 20 s. El A β (1-42) pretratado con HFIP se diluyó en PBS (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) hasta 400 μ M y se añadió 1/10 de volumen de 2% de SDS (en agua) (concentración final de 0,2% de SDS). Una incubación durante 6 horas a 37°C dio lugar al producto intermedio de globulómero A β (1-42) de 16/20-kDa (forma corta para el oligómero globulómero). El globulómero A β (1-42) de 38/48-kDa se generó mediante una dilución adicional con 3 volúmenes de agua e incubación durante 18 horas a 37°C. La reticulación del globulómero A β (1-42) de 38/48-kDa se realizó entonces mediante incubación con glutaraldehído 1 mM durante 2 horas a 21°C de temperatura ambiente, seguido por tratamiento con etanolamina (5 mM) durante 30 min a temperatura ambiente.

EJEMPLO 2: GENERACIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO A β (20-42) HUMANIZADOS

EJEMPLO 2.1: SELECCIÓN DE REGIONES ESTRUCTURALES DE ANTICUERPO HUMANO

La selección de regiones estructurales de anticuerpo humano se basa en la similitud de las estructuras canónicas y la homología de secuencia de aminoácidos de anticuerpos humanos. Además, la retención de residuos de aminoácidos que sostienen estructuras de bucle y la interfaz VL/VH, así como la retención de residuos de aminoácidos de la zona de Vernier, se tuvo en cuenta a la hora de identificar las secuencias estructurales de VL y VH aceptoras adecuadas, basándose en la homología de la secuencia de aminoácidos de las secuencias de la línea germinal humana de V κ y V λ . Por otra parte, la inmunogenicidad de las secuencias de VH y VL resultantes de un injerto de CDRs de 4D10 en secuencias estructurales de VL y VH aceptoras potencialmente adecuadas, se evaluó *in silico* basándose en la afinidad prevista de péptidos solapantes hacia una variedad de alelos del MHC de clase I y/o MHC de clase II. VH y VL se adaptaron al consenso de la familia de VH o VL respectiva para minimizar aún más una inmunogenicidad potencial. Se realizaron retromutaciones seleccionadas en residuos de aminoácidos murinos para conservar aminoácidos que sostienen estructuras de bucle y la interfaz VH/VL. Las frecuencias de estas retromutaciones en mezclas correspondientes de secuencias de VH o VL humanas de origen natural que tienen el gen de la línea germinal de VH o VL respectivo, se determinaron mediante alineaciones de la secuencia de aminoácidos. Las secuencias de VH y VL resultantes de las consideraciones descritas anteriormente, se comprobaron en busca de posibles sitios de glicosilación ligados a N (NXS o NXT, en donde X es cualquier aminoácido excepto P).

EJEMPLO 2.2: HUMANIZACIÓN DEL ANTICUERPO MURINO ANTI-GLOBULÓMERO A β (20-42)

4D10hum_VH.1z (SEQ ID NO:4): Las secuencias de CDR de la cadena pesada del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas VH3-53 y JH6.

4D10hum_VH.1 (SEQ ID NO:5): Las secuencias de CDR de la cadena pesada del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas VH3-53 y JH6 que comprendían el cambio de consenso de VH3, I12V.

4D10hum_VH.1a (SEQ ID NO:6): Las secuencias de CDR de la cadena pesada del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas VH3-53 y JH6 que comprendían el cambio de consenso de VH3, I12V y las retromutaciones de la región estructural A24V, V29L, V48L, S49G, F67L, R71K, N76S y L78V.

4D10hum_VH.1b (SEQ ID NO:7): Las secuencias de CDR de la cadena pesada del anticuerpo 4D10 murino anti-

globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas VH3-53 y JH6 que comprendían las retromutaciones V29L y R71K.

5 4D10hum_VH.2z (SEQ ID NO:8): Las secuencias de CDR de la cadena pesada del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas VH4-59 y JH6.

4D10hum_VH.2 (SEQ ID NO:9): Las secuencias de CDR de la cadena pesada del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas VH4-59 y JH6 que comprendían un cambio Q1E para evitar la formación de piroglutamato N-terminal.

10 4D10hum_VH.2a (SEQ ID NO:10): Las secuencias de CDR de la cadena pesada del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas VH4-59 y JH6 que comprendían un cambio Q1E para evitar la formación de piroglutamato N-terminal, y las retromutaciones de la región estructural G27F, I29L, I37V, I48L, V67L, V71K, N76S y F78V.

15 4D10hum_VH.2b (SEQ ID NO:11): Las secuencias de CDR de la cadena pesada del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas VH4-59 y JH6 que comprendían un cambio Q1E para evitar la formación de piroglutamato N-terminal, y las retromutaciones de la región estructural G27F, I29L y V71K.

4D10hum_Vk.1z (SEQ ID NO:12): Las secuencias de CDR de la cadena ligera del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas Vk A17/2-30 y Jk2.

20 4D10hum_Vk.1 (SEQ ID NO:13): Las secuencias de CDR de la cadena ligera del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas Vk A17/2-30 y Jk2 que comprendían los cambios de consenso de Vk2, S7T, L15P, Q37L, R39K y R45Q.

25 4D10hum_Vk.1a (SEQ ID NO:14): Las secuencias de CDR de la cadena ligera del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas Vk A17/2-30 y Jk2 que comprendían los cambios de consenso de Vk2, S7T, L15P, Q37L, R39K y R45Q y la retromutación de la región estructural F36L que afecta a la interfaz VL/VH.

4D10hum_Vk.1b (SEQ ID NO:15): Las secuencias de CDR de la cadena ligera del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas Vk A17/2-30 y Jk2 que comprendían los cambios de consenso de Vk2, S7T y Q37L.

30 4D10hum_Vk.1c (SEQ ID NO:16): Las secuencias de CDR de la cadena ligera del anticuerpo 4D10 murino anti-globulómero A β (20-42) descritas en la Tabla 4 se injertaron en una región estructural aceptora de secuencias humanas Vk A17/2-30 y Jk2 que comprendían los cambios de consenso de Vk2, S7T, Q37L y R39K.

Algunas de dichas retromutaciones de VH y Vk, los cambios de consenso o la mutación Q1E en 4D10hum_VH.2, 4D10hum_VH.2a o 4D10hum_VH.2b se pueden eliminar durante una maduración por afinidad subsiguiente.

35 EJEMPLO 2.3: CONSTRUCCIÓN DE ANTICUERPOS HUMANIZADOS

Los anticuerpos humanizados construidos *in silico* descritos anteriormente se construyen *de novo* usando oligonucleótidos. Para cada ADNc de la región variable, se diseñan 6 oligonucleótidos de 60-80 nucleótidos cada uno para que se solapen entre sí con 20 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción de reasociación, los 6 oligos se combinan, se hierven y se hibridan en presencia de dNTPs. Entonces se añade la ADN polimerasa I, el fragmento grande (Klenow) (New England Biolabs #M0210, Beverley, MA.) para rellenar los huecos de aproximadamente 40 pb entre los oligonucleótidos solapantes. A continuación, se lleva a cabo una PCR para amplificar el gen entero de la región variable utilizando dos cebadores más exteriores que contienen secuencias que sobresalen, complementarias al sitio de clonación múltiple en un vector pBOS modificado (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) Nucleic Acids Research vol. 18, n° 17)). Los productos de la PCR obtenidos a partir de cada conjunto de ADNc se separan en un gel de agarosa y la banda correspondiente al tamaño del ADNc de una región variable prevista, se escinde y se purifica. La región pesada variable se inserta en marco sobre un fragmento de ADNc que codifica la región constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de aminoácidos de la región bisagra, mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración de la UE) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). La región variable de la cadena ligera se inserta en marco con la región constante kappa humana mediante recombinación homóloga. Las colonias bacterianas se aíslan y se extrae el ADN del plásmido; los insertos de ADNc se secuencian en su totalidad. Las cadenas pesada y ligera humanizadas correctas, correspondientes a cada anticuerpo se cotransfectan en células COS para producir de forma transitoria anticuerpos anti-globulómero A β humanizados de longitud completa. El material sobrenadante celular que contiene el anticuerpo quimérico recombinante se purifica mediante cromatografía de Proteína A-Sefarosa y el anticuerpo unido eluye mediante la adición de tampón ácido. Los anticuerpos se neutraliza y se dializa en PBS. (Dieder Moechars et al J Biol Chem 274:6483 -

6492 (1999); Ausubel, F.M. et al. ed., Short Protocols In Molecular Biology (4ª ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X); Lu y Weiner ed., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) Bio-Techniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X); Kontermann y Dubel ed., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5); Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3ª ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4); Sambrook, J. et al. ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6); Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauffs). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4)).

- 10 Aunque se han descrito anteriormente una serie de realizaciones y características, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar modificaciones y variaciones de las realizaciones y características descritas sin apartarse de la presente descripción o la invención tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 2:4: EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS HUMANIZADOS EN CÉLULAS HEK293

15 Las estructuras artificiales de ADN que codifican una cadena pesada de anticuerpo como se exponen en SEQ ID NO: 46; una cadena pesada de anticuerpo como se expone en SEQ ID NO: 47 y una estructura artificial de cadena ligera de anticuerpo que codifica un polipéptido como se expone en SEQ ID NO: 48, se prepararon como se describe en el ejemplo 2.3. Después de confirmar el ADN mediante secuenciación, todas las estructuras artificiales de ADN de la cadena pesada y de la cadena ligera se expandieron en *E. coli* y el ADN se purificó utilizando Qiagen Endo Free Plasmid Maxi Prep (nº de cat. 12362, QIAGEN) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20 Para la expresión de un anticuerpo monoclonal 4D10hum#1, las células HEK293 (EBNA) se cotransfectaron transitoriamente con plásmidos que codificaban la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 46 y la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 48. Para la expresión de un anticuerpo monoclonal 4D10hum#2, las células HEK293 (EBNA) se cotransfectaron transitoriamente con plásmidos que codificaban la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 47 y la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 48. Antes de la transfección, las células HEK293 (EBNA) se propagaron en medio Freestyle 293 (Invitrogen, Carlsbad CA) a una escala de 0,5 l en matraces de cultivo (2 L Corning nº de cat. 431198) agitando en una incubadora de CO₂ (8% de CO₂, 125 rpm, 37°C). Cuando los cultivos celulares alcanzaron una densidad de 1×10^6 células/ml, las células se transfectaron mediante la adición de un complejo de transfección. El complejo de transfección se preparó mezclando en primer lugar 150 µg del plásmido que codificaba la cadena ligera, 100 µg del plásmido que codificaba la cadena pesada y 25 ml de medio Freestyle, seguido por la adición de 500 µl de solución de PEI (1 mg/ml (pH 7,0) de polietilimina lineal de 25 kDa, Polysciences nº de cat. 23966). El complejo de transfección se mezcló mediante inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min antes de añadirlo al cultivo celular. Después de la transfección, los cultivos continuaron creciendo en la incubadora de CO₂ (8% de CO₂, 125 rpm, 37°C). Veinticuatro horas después de la transfección, los medios de cultivo se complementaron con 50 ml de una solución N1 con 5% de triptona (Organo Technie, La Courneuve Francia nº de cat. 19553).

35 Seis días después de la transfección, las células se sedimentaron por centrifugación (16.000 g, 30 min), el material sobrenadante que contenía los anticuerpos expresados se esterilizó por filtración (filtro de PES de 0,2 µm) y se colocaron a 4°C hasta el inicio de la etapa de purificación. Los anticuerpos expresados se purificaron desde el material sobrenadante mediante cromatografía de afinidad de proteína A sefarosa, utilizando reactivos de Pierce Thermo Scientific y el protocolo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El material eluido de proteína se dializó frente a PBS (pH 7). Los anticuerpos 4D10hum purificados se cuantificaron espectrofotométricamente a 280 nm y se analizaron por espectrometría de masas y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

EJEMPLO 2:5: ANÁLISIS DE LA AFINIDAD DE ANTICUERPOS HUMANIZADOS

La interacción de los anticuerpos humanizados purificados 4D10hum#1 y 4D10hum#2 con el globulímero Aβ(20-42) se evaluó mediante un análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un dispositivo de BIAcore. Fc de cabra anti-IgG humana (10000 UR) se inmovilizó directamente sobre un chip sensor CM5 mediante un procedimiento de acoplamiento de amina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BIAcore). El anticuerpo 4D10hum respectivo fue capturado sobre la superficie del chip recubierta con Fc de cabra anti-IgG humana, mediante una inyección de 5,0 µl de una solución de 1 µg/ml de anticuerpo 4D10hum con un caudal de 10-15 µl/min. La interacción del globulímero Aβ(20-42) soluble con el anticuerpo 4D10hum sobre el chip sensor se examinó mediante la inyección de soluciones de globulímero (intervalo de concentración: 20-0,3125 nM) con un caudal de 50 µl/min. La tasa de asociación se controló durante 5,0 min y la tasa de disociación se controló durante 10 min. A partir de los sensogramas resultantes, se determinó la constante de la tasa de asociación (k_{on}), la constante de la tasa de disociación (k_{off}) y la constante de disociación en equilibrio (K_D) utilizando el programa informático y las instrucciones del fabricante. Las constantes cinéticas y de equilibrio determinadas para tres preparaciones diferentes de 4D10hum#1 y dos preparaciones diferentes de 4D10hum#2, se resumen en la Tabla 7. La Tabla 7 también muestra los datos de la afinidad de los anticuerpos #3, #4 y #5 que tienen cadenas quiméricas y humanizadas. Las cadenas pesadas de los anticuerpos #4 y #5 son como en 4D10hum#1 o #2 y las cadenas ligeras son quimeras de m4D10 VL (SEQ ID NO: 24) y la región constante kappa de Ig humana (SEQ ID NO: 27). Las cadenas ligeras del anticuerpo #3 son como en 4D10hum#1 y #2 y las cadenas pesadas son quimeras de m4D10 VH (SEQ ID NO: 23) y la región constante gamma-1 de Ig humana (SEQ ID NO: 25).

TABLA 7: AFINIDAD DE LOS ANTICUERPOS 4D10HUM HACIA EL GLOBULÓMERO A β (20-42)

Anticuerpo	Lote de anticuerpos	Experimento	k_{on} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
4D10hum#1	#1759115	1	$5,22 \times 10^5$	$3,02 \times 10^{-4}$	$5,78 \times 10^{-10}$
		2	$5,39 \times 10^5$	$3,61 \times 10^{-4}$	$6,71 \times 10^{-10}$
		promedio	$5,31 \times 10^5$	$3,32 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-10}$
	#1763976	1	$4,86 \times 10^5$	$2,81 \times 10^{-4}$	$5,78 \times 10^{-10}$
		2	$5,13 \times 10^5$	$3,04 \times 10^{-4}$	$5,93 \times 10^{-10}$
		promedio	$5,00 \times 10^5$	$2,93 \times 10^{-4}$	$5,86 \times 10^{-10}$
	#1773662	1	$4,66 \times 10^5$	$2,49 \times 10^{-4}$	$5,35 \times 10^{-10}$
		2	$5,18 \times 10^5$	$2,87 \times 10^{-4}$	$5,53 \times 10^{-10}$
		promedio	$4,92 \times 10^5$	$2,68 \times 10^{-4}$	$5,44 \times 10^{-10}$
4D10hum#2	#1759119	1	$5,93 \times 10^5$	$2,70 \times 10^{-4}$	$4,54 \times 10^{-10}$
		2	$5,46 \times 10^5$	$3,32 \times 10^{-4}$	$6,09 \times 10^{-10}$
		promedio	$5,70 \times 10^5$	$3,01 \times 10^{-4}$	$5,32 \times 10^{-10}$
	#1773659	1	$5,07 \times 10^5$	$2,68 \times 10^{-4}$	$5,29 \times 10^{-10}$
		2	$6,86 \times 10^5$	$2,98 \times 10^{-4}$	$4,35 \times 10^{-10}$
		promedio	$5,97 \times 10^5$	$2,83 \times 10^{-4}$	$4,82 \times 10^{-10}$
Anticuerpo		Experimento	k_{on} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
4D10#3 (cadena pesada quimérica; cadena ligera como 4D10hum#1 y #2)		1	$6,03 \times 10^5$	$3,17 \times 10^{-4}$	$5,25 \times 10^{-10}$
		2	$5,22 \times 10^5$	$3,49 \times 10^{-4}$	$6,69 \times 10^{-10}$
		promedio	$5,63 \times 10^5$	$3,33 \times 10^{-4}$	$5,97 \times 10^{-10}$
4D10#4 (cadena pesada como 4D10hum#1; cadena ligera quimérica)		1	$4,62 \times 10^5$	$2,94 \times 10^{-4}$	$6,35 \times 10^{-10}$
		2	$5,06 \times 10^5$	$3,32 \times 10^{-4}$	$6,57 \times 10^{-10}$
		promedio	$4,84 \times 10^5$	$3,13 \times 10^{-4}$	$6,46 \times 10^{-10}$
4D10#5 (cadena pesada como 4D10hum#2; cadena ligera quimérica)		1	$4,94 \times 10^5$	$2,62 \times 10^{-4}$	$5,30 \times 10^{-10}$
		2	$4,72 \times 10^5$	$2,92 \times 10^{-4}$	$6,19 \times 10^{-10}$

ES 2 684 475 T3

Anticuerpo	Lote de anticuerpos	Experimento	$k_{on} [M^{-1}s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
		promedio	$4,83 \times 10^5$	$2,77 \times 10^{-4}$	$5,75 \times 10^{-10}$

EJEMPLO 2.6: ANÁLISIS DE LA SELECTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MEDIANTE TRANSFERENCIA DE PUNTOS

- 5 Con el fin de caracterizar la selectividad de los anticuerpos monoclonales anti-globulómero A β (20-42), se sometió a ensayo la unión a diferentes formas de A β . Para este fin, se prepararon diluciones en serie de las formas de A β (1-42) individuales que variaban desde 100 pmol/ μ l a 0,00001 pmol/ μ l en PBS complementado con 0,2 mg/ml de BSA. Se realizó una transferencia de 1 μ l de cada dilución a una membrana de nitrocelulosa. La detección se realizó por incubación con el anticuerpo correspondiente (0,2 μ g/ml) seguido de inmunotinción usando anti-IgG humana conjugada con peroxidasa y el reactivo de tinción BM Blue POD Substrate (Roche).
- 10 Patrones de A β para la transferencia de puntos:
1. Globulómero A β (1-42)
El globulómero (1-42) se preparó como se describe en el Ejemplo 1a (intercambio de tampón mediante diálisis).
 2. Globulómero A β (20-42)
El globulómero A β (20-42) se preparó como se describe en el Ejemplo 1b.
 - 15 3. Monómero A β (1-40), 0,1% de NaOH
Se disolvieron 2,5 mg de A β (1-40) (Bachem Inc., n $^{\circ}$ de cat. H-1368) en 0,5 ml de 0,1% de NaOH en H $_2$ O (recién preparado) (= 5 mg/ml) y se agitó inmediatamente durante 30 s a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20°C hasta el uso.
 4. Monómero A β (1-42), 0,1% de NaOH
 - 20 Se disolvieron 2,5 mg de A β (1-42) (Bachem Inc., n $^{\circ}$ de cat. H-1368) en 0,5 ml de 0,1% de NaOH en H $_2$ O (recién preparado) (= 5 mg/ml) y se agitó inmediatamente durante 30 s a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20°C hasta el uso.
 5. Fibrillas A β (1-42)
Se disolvió 1 mg de A β (1-42) (Bachem Inc. n $^{\circ}$ de cat.: H-1368) en 500 μ l de NH $_4$ OH acuoso al 0,1% (tubo Eppendorf) y se agitó durante 1 min a temperatura ambiente. Se neutralizaron 100 μ l de esta solución de A β (1-42) recién preparada con 300 μ l de NaH $_2$ PO $_4$ 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4. El pH se ajustó a pH 7,4 con HCl al 1%. La muestra se incubó durante 24 h a 37°C y se centrifugó (10 min a 10000 g). El material sobrenadante se retiró y el sedimento de fibrillas se resuspendió con 400 μ l de NaH $_2$ PO $_4$ 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4, mezclando con agitador vórtex durante 1 min.
 - 30 6. sAPP α
Suministrado por Sigma (n $^{\circ}$ de cat. S9564; 25 μ g en NaH $_2$ PO $_4$ 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). El sAPP α se diluyó hasta 0,1 mg/ml (= 1 pmol/ μ l) con NaH $_2$ PO $_4$ 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA.
 7. Globulómero A β (12-42)
El globulómero A β (12-42) se preparó como se describe en el Ejemplo 1c.
 - 35 Materiales para la transferencia de puntos:
Dilución en serie de patrones de A β (véase más arriba 1. a 7.) en NaH $_2$ PO $_4$ 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 + 0,2 mg/ml de BSA para obtener concentraciones de: 100 pmol/ μ l, 10 pmol/ μ l, 1 pmol/ μ l, 0,1 pmol/ μ l, 0,01 pmol/ μ l, 0,001 pmol/ μ l, 0,0001 pmol/ μ l y 0,00001 pmol/ μ l.
Nitrocelulosa: medio de transferencia Trans-Blot, membrana de nitrocelulosa pura (0,2 μ m); BIORAD
 - 40 Anti-POD humano: n $^{\circ}$ de cat: 109-035-003 (Jackson Immuno Research)
Reactivo de detección: substrato POD azul BM, precipitante, n $^{\circ}$ de cat.: 11442066001 (Roche)
Albúmina de suero bovino, (BSA): n $^{\circ}$ de cat.: 11926 (Serva)

ES 2 684 475 T3

Reactivo de bloqueo: 5% de leche baja en grasa en TBS

Soluciones tampón:

TBS: tampón Tris/HCl 25 mM pH 7,5 + NaCl 150 mM

TTBS: tampón Tris/HCl 25 mM pH 7,5 + NaCl 150 mM + 0,05% de Tween 20

5 PBS + 0,2 mg/ml de BSA: tampón NaH_2PO_4 20 mM pH 7,4 + NaCl 140 mM + 0,2 mg/ml de BSA

Solución de anticuerpo I: 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo en 20 ml de leche baja en grasa al 1% en TBS

Anticuerpo: anticuerpo monoclonal anti-A β humanizado 4D10hum#1; 4,7 mg/ml DO 280 nm; almacenado a -80°C

Solución de anticuerpo II: dilución 1:5000 de anti-POD humano en leche baja en grasa al 1% en TBS

Procedimiento de transferencia de puntos:

10 1) 1 μl de cada una de las 8 concentraciones de los diferentes patrones de A β (obtenidas mediante dilución en serie) se aplica de forma puntiforme sobre la membrana de nitrocelulosa a una distancia de aproximadamente 1 cm entre sí.

2) Se permitió que los puntos de los patrones de A β se secaran sobre la membrana de nitrocelulosa al aire durante al menos 10 min a temperatura ambiente (TA). (= transferencia de puntos)

15 3) Bloqueo:

La transferencia de puntos se incubó con 30 ml de leche baja en grasa al 5% en TBS durante 1,5 h a TA.

4) Lavado:

La solución de bloqueo se retiró y la transferencia de puntos se incubó con agitación con 20 ml de TTBS durante 10 min a TA.

20 5) Solución de anticuerpo I:

El tampón de lavado se retiró y la transferencia de puntos se incubó con solución de anticuerpo I durante 2 h a TA.

6) Lavado:

25 La solución de anticuerpo I se retiró y la transferencia de puntos se incubó con agitación con 20 ml de TTBS durante 10 min a TA. La solución de lavado se retiró y la transferencia de puntos se incubó con agitación con 20 ml de TTBS durante 10 min a TA. La solución de lavado se retiró y la transferencia de puntos se incubó con agitación con 20 ml de TBS durante 10 min a TA.

7) Solución de anticuerpo II:

30 El tampón de lavado se retiró y la transferencia de puntos se incubó con la solución de anticuerpo II durante 1 h a TA

8) Lavado:

35 La solución de anticuerpo II se retiró y la transferencia de puntos se incubó con agitación con 20 ml de TTBS durante 10 min a TA. La solución de lavado se retiró y la transferencia de puntos se incubó con agitación con 20 ml de TTBS durante 10 min a TA. La solución de lavado se retiró y la transferencia de puntos se incubó con agitación con 20 ml de TBS durante 10 min a TA.

9) Desarrollo:

40 La solución de lavado se retiró. La transferencia de puntos se desarrolló con 7,5 ml de sustrato POD azul BM durante 10 min. El desarrollo se detuvo mediante un lavado a fondo de la transferencia de puntos con H_2O . Una evaluación cuantitativa se realizó basándose en un análisis densitométrico (densitómetro GS800 (BioRad)) y el paquete de programas informáticos Quantity one, versión 4.5.0 (BioRad)) de la intensidad del punto. Solo se evaluaron los puntos que tenían una densidad relativa mayor del 20% de la densidad relativa del último punto identificado ópticamente de forma inequívoca del globulómero A β (20-42). Este valor umbral se determinó para cada transferencia de puntos de manera independiente. El valor calculado indica la relación entre el reconocimiento del globulómero A β (20-42) y la forma de A β respectiva para el anticuerpo dado.

45 El análisis de la transferencia de puntos se realizó con anticuerpo monoclonal humanizado 4D10hum#1 anti-A β . Las

formas de A β individuales se aplicaron en diluciones seriadas y se incubaron con los anticuerpos respectivos para la reacción inmune (1 = globulómero A β (1-42); 2 = globulómero A β (20-42); 3 = monómero A β (1-40), 0,1% de NaOH; 4 = monómero A β (1-42), 0,1% de NaOH; 5 = preparación de fibrillas A β (1-42); 6 = sAPP α (Sigma); (primer punto: 1 pmol)). Los resultados se resumen en la Tabla 8.

5 TABLA 8: DATOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA TRANSFERENCIA DE PUNTOS

ANTÍGENO	ANTICUERPO: 4D10hum#1
globulómero A β (1-42)	>10000
globulómero A β (20-42)	1
monómero A β (1-40) en 0,1% de NaOH	72000
monómero A β (1-42) en 0,1% de NaOH	72000
Fibrillas A β (1-42)	>10000
sAPP α	>100
globulómero A β (12-42)	11

EJEMPLO 3: DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN CRUZADA CON EL FACTOR PLAQUETARIO 4

EJEMPLO 3.1: DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN CRUZADA CON EL FACTOR PLAQUETARIO 4 EN PLASMA DE MACACO CANGREJERO MEDIANTE ELISA DE TIPO SÁNDWICH

10 Lista de reactivos:

Inmuno-placa F96 Cert. Maxisorp NUNC nº de cat. 439454

Anticuerpos de unión en el experimento E1:

- Anticuerpo monoclonal humanizado anti-A β 4D10hum#1; 2,36 mg/ml DO 280 nm; almacenado a -80°C
- Anticuerpo monoclonal humanizado anti-A β 4D10hum#2; 1,74 mg/ml DO 280 nm; almacenado a -80°C
- 15 - Anticuerpo monoclonal quimérico humano/ratón anti-A β clon h1G5 tipo silvestre marco Fc (chim h1G5 wt); 0,99 mg/ml DO 280 nm; almacenado a -80°C (utilizado como control positivo)
- Anticuerpo policlonal humano purificado por afinidad hIgG1 (Chemicon (Millipore), nº de cat. AG502); 1,00 mg/ml DO 280 nm; almacenado a -80°C (utilizado como control negativo)

Anticuerpos de unión en el experimento de referencia R1:

- 20 - Anticuerpo monoclonal anti-HPF4; 4,2 mg/ml DO 280 nm; Abcam nº de cat. ab49735; almacenado a -30°C (utilizado como control positivo)
- Anticuerpo monoclonal anti-A β clon m1G5; 1,70 mg/ml DO 280 nm; almacenado a -80°C
- Anticuerpo monoclonal anti-A β clon m4D10; 8,60 mg/ml DO 280 nm; almacenado a -80°C
- 25 - Anticuerpo monoclonal clon mIgG2a; 7,89 mg/ml DO 280 nm; almacenado a -80°C (utilizado como control negativo)

Tampón de recubrimiento: hidrógeno carbonato de sodio 100 mM; pH 9,6

Reactivo de bloqueo para ELISA; Roche Diagnostics GmbH. nº de cat.: 1112589

Tampón PBST: NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05% de Tween 20; pH 7,4

30 Tampón PBST + 0,5% de BSA: NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 140 mM; 0,05% de Tween 20; pH 7,4 + 0,5% de BSA; Serva nº de cat. 11926

Plasma de macaco cangrejero: mezcla de plasma macaco cangrejero con EDTA de 13 donantes diferentes; almacenado a -30°C

Inhibidor de tripsina: Sigma nº de cat. T7902

ES 2 684 475 T3

Anticuerpo primario: pRAb-HPF4; 0,5 mg/ml; Abcam nº de cat. ab9561

Reactivo marcador: conjugado de anti-conejo-POD; Jackson ImmunoResearch Ltd. nº de cat.: 111-036-045

Solución de tinción: TMB 42 mM (Roche Diagnostics GmbH nº de cat.: 92817060) en DMSO; 3% de H₂O₂ en agua; acetato de sodio 100 mM, pH 4,9

5 Solución de parada: ácido sulfónico 2 M

Método utilizado en la preparación de reactivos:

Anticuerpo de unión:

Los anticuerpos de unión se diluyeron hasta 10 µg/ml en tampón de recubrimiento.

Solución de bloqueo:

10 El reactivo de bloqueo se disolvió en 100 ml de agua para preparar la solución de bloqueo de reserva y se almacenaron partes alícuotas de 10 ml a -20°C. Se diluyeron 3 ml de solución de bloqueo con 27 ml de agua para bloquear cada placa.

Preparación de solución plasmática de reserva de macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*):

15 Se centrifugaron 2 ml de la mezcla de plasma de macaco cangrejero durante 10 min a 10.000 g. Se retiraron 1,58 ml del material sobrenadante y se diluyeron con 3,42 ml de tampón PBST + 0,5% de BSA (= dilución 1:3,16). Después se añadieron 50 µl de 10 mg/ml de inhibidor de tripsina en H₂O. Después de incubar durante 10 min a temperatura ambiente, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore nº de cat. SLGS0250S).

Serie de diluciones de la solución plasmática de reserva de macaco cangrejero:

Nº	Volumen de dilución del plasma de macaco cangrejero	Volumen de tampón PBST + 0,5% de BSA	Dilución final del plasma de macaco cangrejero
1	250 µl de solución de reserva	0 ml	1:3,16
2	79 µl (1)	171 µl	1:10
3	79 µl (2)	171 µl	1:31,6
4	79 µl (3)	171 µl	1:100
5	79 µl (4)	171 µl	1:316
6	79 µl (5)	171 µl	1:1000
7	79 µl (6)	171 µl	1:3160
8	0 µl	250 µl	solo tampón

20 Solución de anticuerpo primario:

El anticuerpo primario se diluyó hasta 1 µg/ml en tampón PBST + 0,5% de BSA. El factor de dilución era 1:500. La solución de anticuerpo se usó inmediatamente.

Reactivo marcador:

25 Un conjugado de anti-conejo-POD liofilizado se reconstituyó en 0,5 ml de agua. Se añadieron 500 µl de glicerol y partes alícuotas de 100 µl se almacenaron a -20°C para un uso posterior. El reactivo marcador concentrado se diluyó en tampón PBST. El factor de dilución era de 1:10.000. El reactivo se usó inmediatamente.

Solución de TMB:

Se mezclaron 20 ml de acetato de sodio 100 mM, pH 4,9, con 200 µl de solución de reserva de TMB y 29,5 µl de solución de peróxido al 3%. La solución se usó inmediatamente.

ES 2 684 475 T3

Configuración de la placa estándar para el experimento E1. Diluciones de plasma de macaco cangrejero. Se debe tener en cuenta que cada muestra se ejecutó por duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Control positivo chim h1G5 wt		4D10hum#1		4D10hum#2		Control negativo hlgG1					
A	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
B	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
C	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
D	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
E	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
F	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
G	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna

5 Configuración de la placa estándar para el experimento de referencia R1. Diluciones de plasma de macaco cangrejero. Se debe tener en cuenta que cada muestra se ejecutó por duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Control positivo anti-HPF4		mAb m1G5		mAb m4D10		Control negativo mlgG2a					
A	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	1:3,16	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
B	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
C	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	1:31,6	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
D	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
E	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
F	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
G	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna

Procedimiento utilizado:

1. Se aplicaron 100 µl de solución de anticuerpo de unión por pocillo y se incubaron durante una noche a 4°C.
2. La solución de anticuerpo se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
- 10 3. Se añadieron 265 µl de solución de bloqueo por pocillo y se incubaron 1,5 h a temperatura ambiente.
4. La solución de bloqueo se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
5. Después de preparar la serie de diluciones de plasma de macaco cangrejero, se aplicaron 100 µl por pocillo de estas diluciones a la placa. La placa se incubó 2 h a temperatura ambiente.
- 15 6. Las diluciones de plasma de macaco cangrejero se desecharon y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
7. Se añadieron 100 µl de solución de anticuerpo primario por pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.
8. La solución de anticuerpo primario se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
- 20 9. Se añadieron 200 µl de solución de marcador por pocillo y se incubaron 1 h a temperatura ambiente.
10. La solución de marcador se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.

11. Se añadieron 100 µl de solución TMB a cada pocillo.

12. El color de la placa se supervisó durante el desarrollo (5 - 15 minutos a temperatura ambiente) y la reacción terminó mediante la adición de 50 µl/pocillo de solución de parada cuando se había desarrollado un color apropiado.

5 13. La absorbancia se leyó a 450 nm.

Análisis de los datos:

Los factores de dilución de plasma (valores X) se transformaron a logaritmo usando la ecuación: $X = \log(X)$. Los datos se representaron gráficamente usando los valores de X transformados logarítmicamente en el eje X expresados como la dilución de plasma (1:X). El valor de la $DO_{450\text{ nm}}$ del blanco PBST respectivo en la fila H, se restó de los valores de la serie de diluciones de plasma de cada columna en la fila A - G. Los valores de $DO_{450\text{ nm}}$ de fondo corregidos resultantes se representaron gráficamente en el eje Y. Las curvas de efecto de dilución se calcularon a partir de estos puntos de datos, ajustando con el empleo de "una ecuación logística de cuatro parámetros" de regresión no lineal con un método de ajuste "por mínimos cuadrados (ordinario)" (que iguala al método de ajuste por "dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable)") utilizando el paquete de programas informáticos para análisis de datos GraphPadPrism (versión 5.03; GraphPad Software Inc.). El ajuste de la curva se llevó a cabo con el único propósito de visualización de datos, pero no como base para cálculos adicionales, es decir, el cálculo del área bajo la curva. Se determinó el área bajo la curva (AUC o área de pico total) basándose en los datos no ajustados a la curva, los valores de X transformados en logaritmo y los valores de $DO_{450\text{ nm}}$ en el intervalo medido (diluciones de plasma finales de 1:3,16 a 1:3160). Los siguientes parámetros de cálculo se utilizaron dentro del paquete de programas informáticos para análisis de datos GraphPadPrism (versión 5.03; GraphPad Software Inc.):

- La línea de base se establece en $Y = 0,0$.
- Altura mínima del pico: Ignorar los picos que son menores del 10% de la distancia de Y mínimo a Y máximo.
- Dirección del pico: Por definición, todos los picos deben ir por encima de la línea de base.

25 Para cada anticuerpo individual se calculó un factor de discriminación de PF4 utilizando el anticuerpo anti-HPF4 disponible comercialmente (Abcam nº de cat.: ab49735) como un anticuerpo de referencia para el reconocimiento de PF4, en donde

$$[\text{Factor de discriminación de PF4}] = \frac{[\text{área de pico total del anticuerpo anti-HPF4 ab49735}]}{[\text{área de pico total que se va a determinar}]}$$

Nota: El factor de discriminación de PF4 se calculó basándose en los valores de las AUCs de anticuerpos anti-HPF4 obtenidos en el experimento de referencia, ya que no existe una versión humana de un anti-HPF4.

30 Los resultados del experimento E1 y del experimento de referencia R1 se muestran en las Figuras 20A y 22A, así como en las Tablas 9A y 9B.

EJEMPLO 3.2: DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN CRUZADA CON EL FACTOR PLAQUETARIO 4 EN PLASMA HUMANO A TRAVÉS DE UN ELISA DE TIPO SÁNDWICH

35 Se emplearon los mismos reactivos y procedimientos para la preparación de los reactivos que para el Ejemplo 3.1 excepto:

El plasma humano (mezcla de plasma humano con EDTA procedente de 4 donantes diferentes; almacenado a -30°C) enriquecido con PF4 humano (7,3 mg/ml; Molecular Innovación nº de cat. HPF4; almacenado a -30°C) se utilizó en lugar de plasma de macaco cangrejero. La solución de reserva de plasma humano enriquecida con HPF4 se preparó del modo siguiente.

40 A) Preparación de la dilución de plasma humano:

Se centrifugaron 2 ml de mezcla de plasma humano durante 10 min a 10.000 g. Se retiraron 1,58 ml del material sobrenadante y se diluyeron con 3,42 ml de PBST + 0,5% de BSA (= dilución 1:3,16). Después se añadieron 50 µl de 10 mg/ml de inhibidor de tripsina en H_2O . Después de incubar durante 10 min a temperatura ambiente, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore nº de cat. SLGS0250S).

45 B) Preparación de la solución de reserva de HPF4:

Se añadió 1 µl de HPF4 a 99 µl de tampón PBST + 0,5% de BSA = 73 µg/ml.

C) Preparación de la solución de reserva de plasma humano enriquecido con 10 ng/ml de HPF4:

Se añadieron 0,69 µl de 73 µg/ml de solución de reserva de HPF4 a 5 ml de plasma humano diluido 1:3,16 resultando 10 ng/ml de HPF4 para enriquecer la dilución de plasma de reserva humano.

5 La preparación de una serie de diluciones, la configuración de la placa estándar, el procedimiento experimental y el análisis de datos para el ELISA de tipo sándwich con plasma humano enriquecido con HPF4, eran análogos a los descritos para el ELISA de tipo sándwich con plasma de macaco cangrejero en el Ejemplo 3.1.

Anticuerpos de unión en el experimento E2: iguales a los utilizados en el experimento E1 en el Ejemplo 3.1. Anticuerpos de unión en el experimento de referencia R2: iguales a los utilizados en el experimento de referencia R1 en el Ejemplo 3.1.

10 Los resultados del experimento E2 y el experimento de referencia R2 se muestran en las Figuras 20B y 22B, así como en las Tablas 9A y 9B.

TABLA 9A: AUC (O ÁREA PICO TOTAL) CALCULADA A PARTIR DE LOS DATOS TRANSFORMADOS EN LOGARITMO DE LOS EXPERIMENTOS E1 Y E2 REPRESENTADOS EN LAS FIGURAS 20A Y 20B

		Control positivo chim h1G5 wt ¹	mAb 4D10hum#1	mAb 4D10hum#2	Control negativo hlgG1
Plasma de macaco cangrejero (datos de la Figura 20A)	Área bajo la curva ²	1,255	0,042	0,075	0,075
	Relación HPF4/anticuerpo aAβ	2	64	36	27
Plasma humano (datos de la Figura 20B)	Área bajo la curva ²	0,949	0,067	0,116	0,113
	Relación HPF4/anticuerpo aAβ	2	30	17	18

¹) chim h1G5 wt es un anticuerpo como se describe en el documento WO 2007/062853, es decir, un anticuerpo monoclonal que tiene una afinidad de unión hacia el globulímero Aβ(20-42) que es mayor que su afinidad de unión hacia el globulímero Aβ(1-42).

²) El área bajo la curva se calculó como se describe en el ejemplo 3.1.

15 TABLA 9B: AUC (O ÁREA PICO TOTAL) CALCULADA A PARTIR DE LOS DATOS TRANSFORMADOS EN LOGARITMO DE LOS EXPERIMENTOS DE REFERENCIA R1 Y R2 REPRESENTADOS EN LAS FIGURAS 22A Y 22B

		Control positivo anti-HPF4	mAb m1G5 ¹	mAb m4D10	Control negativo mlgG2a
Plasma de macaco cangrejero (datos de la Figura 22A)	Área bajo la curva ²	2,681	0,861	0,086	0,005
	Relación HPF4/anticuerpo aAβ	1	3	31	517
Plasma humano (datos de la Figura 22B)	Área bajo la curva ²	1,986	0,311	0,093	0,006
	Relación HPF4/anticuerpo aAβ	1	6	21	331

¹) m1G5 es un anticuerpo como se describe en el documento WO 2007/062853, es decir, un anticuerpo monoclonal que tiene una afinidad de unión hacia el globulímero Aβ(20-42) que es mayor que su afinidad de unión hacia el globulímero Aβ(1-42).

²) El área bajo la curva se calculó como se describe en el ejemplo 3.1.

EJEMPLO 3.3: DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN CRUZADA CON EL FACTOR PLAQUETARIO 4 EN PLASMA DE MACACO CANGREJERO MEDIANTE UN ELISA DE TIPO SÁNDWICH ALINEADO

20 Se utilizan los reactivos descritos en el Ejemplo 3.1 y los anticuerpos para alineación anti-IgG de ratón (específicos de Fc; producidos en cabra; Sigma n° de cat.: M3534; 2,3 mg/ml; almacenados a -20°C para anticuerpos de unión murinos en el experimento de referencia R3) y anti-IgG humana (específico de Fc; producido en cabra; Sigma n° de cat.: I2136; 2,2 mg/ml; almacenado a -20°C, para anticuerpos de unión de ser humano, humanizados y quimeras humano/ratón en el experimento E3).

25 Métodos utilizados en la preparación de reactivos:

La solución de bloqueo, el anticuerpo primario y la solución de TMB se prepararon como se describe en el Ejemplo

3.1.

Cada anticuerpo para alineación se diluyó hasta 10 µg/ml en tampón de recubrimiento.

Anticuerpos de unión en el experimento E3: iguales a los utilizados en el experimento E1 en el Ejemplo 3.1. Anticuerpos de unión en el experimento de referencia R3: iguales a los utilizados en el experimento de referencia R1 en el Ejemplo 3.1.

5

Cada anticuerpo de unión se diluyó con tampón PBST + 0,5% de BSA hasta 10 µg/ml (solución de reserva) y se prepararon series de diluciones de la siguiente manera:

Nº	Volumen de dilución del anticuerpo	Volumen de tampón PBST + 0,5% de BSA	Concentración final de anticuerpo
1	250 µl de solución de reserva	0 ml	10000 ng/ml
2	79 µl (1)	171 µl	3160 ng/ml
3	79 µl (2)	171 µl	1000 ng/ml
4	79 µl (3)	171 µl	316 ng/ml
5	79 µl (4)	171 µl	100 ng/ml
6	79 µl (5)	171 µl	31,6 ng/ml
7	79 µl (6)	171 µl	10 ng/ml
8	0 µl	250 µl	Solo tampón

Plasma de macaco cangrejero:

- 10 Se centrifugaron 400 µl de una mezcla de plasma de macaco cangrejero durante 10 min a 10.000 g. Se retiraron 158 µl de material sobrenadante y se diluyeron con 684 µl de PBST + 0,5% de BSA (= dilución 1:3,16). Después se añadieron 10 µl de 10 mg/ml de inhibidor de tripsina en H₂O. Después de incubar durante 10 min a temperatura ambiente, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore nº de cat. SLGS0250S). Después de esto, 500 µl de esta muestra de plasma diluida 1:3,16 se diluyeron de nuevo 1:31,6 con 15,3 ml de tampón PBST + 0,5% de BSA, dando como resultado una dilución total de 1:100.
- 15

Reactivo marcador:

El conjugado anti-conejo-POD liofilizado se reconstituyó en 0,5 ml de agua. Se añadieron 500 µl de glicerol y se almacenaron partes alícuotas de 100 µl a -20°C para un uso posterior. El reactivo marcador concentrado se diluyó en tampón PBST. El factor de dilución era de 1:5000. El reactivo se usó inmediatamente.

- 20 Configuración de la placa de anticuerpo de unión para el Experimento E2. Diluciones de anticuerpos de unión. Se debe tener en cuenta que cada concentración de cada anticuerpo de unión se ejecutó por duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Control positivo chim h1G5 wt		4D10hum#1		4D10hum#2		Control negativo hIgG1					
A	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
B	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
C	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
D	316	316	316	316	316	316	316	316	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
E	100	100	100	100	100	100	100	100	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
F	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
G	10	10	10	10	10	10	10	10	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna

Configuración de la placa de anticuerpo de unión para el Experimento de Referencia R3. Diluciones de anticuerpos de unión. Se debe tener en cuenta que cada concentración de cada anticuerpo de unión se ejecutó por duplicado.

ES 2 684 475 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Control positivo anti-HPF4		mAb m1G5		mAb m4D10		Control negativo mIgG2a					
A	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
B	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
C	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
D	316	316	316	316	316	316	316	316	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
E	100	100	100	100	100	100	100	100	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
F	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
G	10	10	10	10	10	10	10	10	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna

Procedimiento utilizado:

- 5 1. Se aplicaron 100 µl de la solución de anticuerpo para alineación respectivo (anti-IgG humana para el experimento E3; anti-IgG murina para el experimento de referencia R3) por pocillo y se incubaron durante una noche a 4°C.
2. La solución de anticuerpo se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
3. Se añadieron 265 µl de solución de bloqueo por pocillo y se incubaron 2 h a temperatura ambiente.
4. La solución de bloqueo se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
- 10 5. Después de preparar la serie de diluciones de cada anticuerpo de unión, se aplicaron 100 µl por pocillo de estas diluciones a la placa. La placa se incubó 2 h a temperatura ambiente.
6. Las soluciones de anticuerpo se desecharon y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
7. Se añadieron 100 µl de una dilución 1:100 de plasma de macaco cangrejero por pocillo y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente.
- 15 8. La solución de plasma se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
9. Se añadieron 100 µl de solución de anticuerpo primario por pocillo y se incubaron 1 h a temperatura ambiente.
10. La solución de anticuerpo primario se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
- 20 11. Se añadieron 200 µl de reactivo marcador por pocillo y se incubaron 1 h a temperatura ambiente.
12. El reactivo marcador se desechó y los pocillos se lavaron tres veces con 250 µl de tampón PBST.
13. Se añadieron 100 µl de solución TMB a cada pocillo.
- 25 14. El color de la placa se supervisó durante el desarrollo (5 - 15 minutos a temperatura ambiente) y la reacción terminó mediante la adición de 50 µl/pocillo de solución de parada cuando se había desarrollado un color apropiado.
15. La absorbancia se leyó a 450 nm.

30 Se realizó el análisis de los datos como se describe para el ELISA de tipo sándwich con plasma de macaco cangrejero en el Ejemplo 3.1, excepto que no se emplearon los factores de dilución del plasma sino las cantidades de anticuerpo (expresadas en ng/ml) como valores de X y de este modo se calcularon las curvas de efecto de concentración. Por consiguiente, el área bajo la curva se determinó basándose en los datos no ajustados a la curva, los valores de X transformados logarítmicamente y los valores de la $DO_{450\text{ nm}}$ en el intervalo medido (concentraciones de anticuerpo final de 10 ng/ml a 10.000 ng/ml).

Los resultados del experimento E3 y del experimento de referencia R3 se muestran en las Figuras 21A y 23A, así como en las Tablas 10A y 10B.

EJEMPLO 3.4: DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN CRUZADA CON EL FACTOR PLAQUETARIO 4 EN PLASMA HUMANO MEDIANTE UN ELISA DE TIPO SÁNDWICH ALINEADO

Para la preparación de los reactivos se emplearon los mismos reactivos y procedimientos que en el Ejemplo 3.3 excepto:

- 5 Cada anticuerpo para alineación utilizado para el experimento E4, se diluyó hasta 10 µg/ml en tampón de recubrimiento y cada anticuerpo para alineación utilizado para el experimento R4, se diluyó hasta 50 µg/ml en el recubrimiento

10 Se empleó plasma humano (mezcla de plasma humano con EDTA procedente de 4 donantes diferentes; almacenado a -30°C) enriquecido con PF4 humano (7,3 mg/ml; Molecular Innovation nº de cat. HPF4; almacenado a -30°C) en lugar de plasma de macaco cangrejero. La solución de reserva de plasma humano enriquecido con HPF4 se preparó del modo siguiente.

A) Preparación de la dilución de plasma humano:

15 Se centrifugaron 4 ml de mezcla de plasma humano durante 10 min a 10.000 g. Se retiraron 3,16 ml del material sobrenadante y se diluyeron con 6,84 ml de PBST + 0,5% de BSA (= dilución 1:3,16). Después se añadieron 100 µl de 10 mg/ml de inhibidor de tripsina en H₂O. Después de incubar durante 10 min a temperatura ambiente, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore nº de cat. SLGS0250S). Posteriormente 5 ml de esta muestra de plasma diluida 1:3,16 se diluyó de nuevo 1:3,16 con 10,8 ml de tampón PBST + 0,5% de BSA dando lugar a una dilución total de 1:10.

B) Preparación de la solución de reserva de HPF4:

20 Se añadió 1 µl de HPF4 a 99 µl de tampón PBST + 0,5% de BSA = 73 µg/ml.

C) Preparación de la solución de reserva de plasma humano enriquecido con 10 ng/ml de HPF4:

Se añadieron 1,64 µl de 73 µg/ml de solución de reserva de HPF4 a 12 ml de plasma humano diluido 1:10 dando como resultado 10 ng/ml de HPF4 para enriquecer la dilución de reserva de plasma humano.

25 La preparación de una serie de diluciones de los anticuerpos de unión, la configuración de la placa de anticuerpos de unión, la preparación de la solución de bloqueo, el anticuerpo primario, el reactivo y la solución de TMB eran los mismos que en el Ejemplo 3.3.

Anticuerpo para alineación y anticuerpos de unión en el experimento E4: iguales a los utilizados en el experimento E3 en el Ejemplo 3.3.

30 Anticuerpo para alineación y anticuerpos de unión en el experimento de referencia R4: iguales a los utilizados en el experimento de referencia R4 en el Ejemplo 3.3.

El procedimiento experimental (pero usando plasma humano diluido 1:10 en la etapa 7) y el análisis de datos para el ELISA de tipo sándwich alineado con plasma humano enriquecido con HPF4, eran análogos a los descritos para el ELISA de tipo sándwich alineado con plasma de macaco cangrejero en el Ejemplo 3.3.

35 Los resultados del experimento E4 y el experimento de referencia R4 se muestran en las Figuras 21B y 23B, así como en las Tablas 10A y 10B.

TABLA 10A: AUC (O ÁREA PICO TOTAL) CALCULADA A PARTIR DE LOS DATOS TRANSFORMADOS EN LOGARITMO DE LOS EXPERIMENTOS E3 Y E4 REPRESENTADOS EN LAS FIGURAS 21A Y 21B

		Control positivo chim h1G5 wt ¹	mAb 4D10hum#1	mAb 4D10hum#2	Control negativo hlgG1
Plasma de macaco cangrejero (datos de la Figura 21A)	Área bajo la curva ²	0,290	0,030	0	0
	Relación HPF4/anticuerpo aAβ	16	158	>158 ³	>158 ³
Plasma humano (datos de la Figura 21B)	Área bajo la curva ²	0,106	0,168	0,051	0,024
	Relación HPF4/anticuerpo aAβ	36	23	75	157

¹) chim h1G5 wt es un anticuerpo como se describe en el documento WO 2007/062853, es decir, un anticuerpo monoclonal que tiene una afinidad de unión hacia el globulímero Aβ(20-42) que es mayor que su afinidad de unión hacia el globulímero Aβ(1-42).

²) El área bajo la curva se calculó como se describe en el ejemplo 3.3.

		Control positivo chim h1G5 wt ¹	mAb 4D10hum#1	mAb 4D10hum#2	Control nega- tivo hlgG1
³⁾ Para los anticuerpos 4D10hum#2 e hlgG1, la actividad de unión de HPF4 era tan baja que la AUC se calculó que era 0. Por lo tanto no se pudo calcular la relación HPF4/anticuerpo aA β y se indicó que era >158 (el cociente más alto alcanzado por otro anticuerpo (4D10hum#1) en este ensayo).					

TABLA 10B: AUC (O ÁREA PICO TOTAL) CALCULADA A PARTIR DE LOS DATOS TRANSFORMADOS EN LOGARITMO DE LOS EXPERIMENTOS DE REFERENCIA R3 Y R4 REPRESENTADOS EN LAS FIGURAS 21A Y 21B

		Control positivo anti-HPF4	mAb m1G5 ¹	mAb m4D10	Control negativo mIgG2a
Plasma de macaco cangreje- ro (datos de la Figura 23A)	Área bajo la curva ²	4,781	0,2768	0,04066	0,01473
	Relación HPF4/anticuerpo aA β	1	17	118	325
Plasma humano (datos de la Figura 23B)	Área bajo la curva ²	3,844	0,165	0,141	0,033
	Relación HPF4/anticuerpo aA β	1	23	27	118
¹⁾ m1G5 es un anticuerpo como se describe en el documento WO 2007/062853, es decir, un anticuerpo monoclonal que tiene una afinidad de unión hacia el globulómero A β (20-42) que es mayor que su afinidad de unión hacia el globulómero A β (1-42). ²⁾ El área bajo la curva se calculó como se describe en el ejemplo 3.3.					

5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Abbott Laboratories et al.

<120> Proteínas que se unen a beta amiloide

<130> 10419PCT

10 <160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 113

< 212> PRT

15 < 213> sintética

<220>

< 221> característica_misc

< 222> (7)..(7)

< 223> Xaa puede ser Ser o Thr

20 <220>

< 221> característica_misc

< 222> (15)..(15)

< 223> Xaa puede ser Leu o Pro

25 <220>

< 221> característica_misc

< 222> (41)..(41)

< 223> Xaa puede ser Phe o Leu

<220>
 < 221> característica_misc
 < 222> (48)..(48)
 < 223> Xaa puede ser Val o Leu

5
 <220>
 < 221> característica_misc
 < 222> (49)..(49)
 < 223> Xaa puede ser Ser o Gly

10
 <220>
 < 221> característica_misc
 < 222> (67)..(67)
 < 223> Xaa puede ser Phe o Leu

15
 <220>
 < 221> característica_misc
 < 222> (71)..(71)
 < 223> Xaa puede ser Arg o Lys

20
 <220>
 < 221> característica_misc
 < 222> (76)..(76)
 < 223> Xaa puede ser Asn o Ser

25
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Xaa Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Xaa Ser Gly Phe Thr Xaa Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45
 Xaa Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60
 Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Asn Ser Lys Xaa Thr Xaa Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

30
 <210> 3
 < 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> sintética

<220>
 < 221> característica_misc

- < 222> (1)..(1)
< 223> Xaa puede ser Gln o Glu
- 5 <220>
< 221> característica_misc
< 222> (27)..(27)
< 223> Xaa puede ser Gly o Phe
- 10 <220>
< 221> característica_misc
< 222> (29)..(29)
< 223> Xaa puede ser Ile o Leu
- 15 <220>
< 221> característica_misc
< 222> (37)..(37)
< 223> Xaa puede ser Ile o Val
- 20 <220>
< 221> característica_misc
< 222> (48)..(48)
< 223> Xaa puede ser Ile o Leu
- 25 <220>
< 221> característica_misc
< 222> (67)..(67)
< 223> Xaa puede ser Val o Leu
- 30 <220>
< 221> característica_misc
< 222> (71)..(71)
< 223> Xaa puede ser Val o Lys
- <220>
< 221> característica_misc
< 222> (76)..(76)
< 223> Xaa puede ser Asn o Ser
- <220>
< 221> característica_misc
< 222> (78)..(78)
< 223> Xaa puede ser Phe o Val

ES 2 684 475 T3

<400> 3

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

<210> 4

< 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> SINTÉTICA

5

<400> 4

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

10

<210> 5

< 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> SINTÉTICA

ES 2 684 475 T3

<400> 5

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

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

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

Ser Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

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

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

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 6

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> SINTÉTICA

5

<400> 6

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

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

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

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

10

<210> 7

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> SINTÉTICA

ES 2 684 475 T3

<400> 7

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

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

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

Ser Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

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

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

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 8

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> SINTÉTICA

5

<400> 8

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 9

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> SINTÉTICA

10

ES 2 684 475 T3

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 10

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> SINTÉTICA

5

<400> 10

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 11

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> SINTÉTICA

10

ES 2 684 475 T3

<400> 11

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

5

<210> 12
 < 211> 113
 < 212> PRT
 < 213> SINTÉTICA

<400> 12

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

10

Arg

<210> 13
 < 211> 113
 < 212> PRT
 < 213> SINTÉTICA

ES 2 684 475 T3

<400> 13

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile
20 25 30

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

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly
85 90 95

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

Arg

5

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> SINTÉTICA

<400> 14

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile
20 25 30

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

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly
85 90 95

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

10

Arg

<210> 15

<211> 113

ES 2 684 475 T3

< 212> PRT
< 213> SINTÉTICA

<400> 15

5

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

Arg

<210> 16
< 211> 113
< 212> PRT
< 213> SINTÉTICA

10

<400> 16

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

Arg

ES 2 684 475 T3

<210> 17
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> sintética

5

<400> 17
 Ser Tyr Gly Val His
 1 5

<210> 18
 < 211> 16
 < 212> PRT
 < 213> sintética

10

<400> 18
 Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser
 1 5 10 15

<210> 19
 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> sintética

15

<400> 19
 Asn Ser Asp Val
 1

<210> 20
 < 211> 16
 < 212> PRT
 < 213> sintética

20

<400> 20
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

25

<210> 21
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> sintética

<400> 21
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

30

<210> 22
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> sintética

<400> 22
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
 1 5

35

<210> 23
 < 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> sintética

40

ES 2 684 475 T3

<400> 23

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 24

< 211> 113

< 212> PRT

< 213> sintética

5

<400> 24

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile
20 25 30

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

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

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

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

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

10

Arg

<210> 25

< 211> 330

< 212> PRT

< 213> sintética

ES 2 684 475 T3

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

ES 2 684 475 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 26
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> sintética

<400> 26
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

ES 2 684 475 T3

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 27
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> sintética

ES 2 684 475 T3

<400> 27

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 28

< 211> 105

< 212> PRT

< 213> sintética

5

<400> 28

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

10

<210> 29

< 211> 43

< 212> PRT

< 213> sintética

ES 2 684 475 T3

<400> 29

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
35 40

5

<210> 30
<211> 42
<212> PRT
<213> sintética

<400> 30

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

10

<210> 31
<211> 42
<212> PRT
<213> sintética

<400> 31

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

15

<210> 32
<211> 31
<212> PRT
<213> sintética

<400> 32

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn
1 5 10 15

20

Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
20 25 30

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> sintética

ES 2 684 475 T3

<400> 33
Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
1 5 10 15

Val Gly Gly Val Val Ile Ala
20

5
<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> sintética

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

10
<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> sintética

<400> 35
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

15
<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> sintética

20
<400> 36
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

25
<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> sintética

<400> 37
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30
<210> 38
<211> 30
<212> PRT
<213> sintética

<400> 38
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

ES 2 684 475 T3

<210> 39
 < 211> 14
 < 212> PRT
 < 213> sintética

5

<400> 39
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 40
 < 211> 32
 < 212> PRT
 < 213> sintética

10

<400> 40
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 41
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> sintética

15

<400> 41
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 42
 < 211> 23
 < 212> PRT
 < 213> sintética

20

<400> 42
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

<210> 43
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> sintética

25

<400> 43
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

30

<210> 44
 < 211> 32
 < 212> PRT
 < 213> sintética

ES 2 684 475 T3

<400> 44

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 45

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> sintética

5

<400> 45

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 46

< 211> 442

< 212> PRT

< 213> sintética

10

<400> 46

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

15

ES 2 684 475 T3

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60

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

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

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

ES 2 684 475 T3

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

ES 2 684 475 T3

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 48
 < 211> 219
 < 212> PRT
 < 213> sintética

<400> 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile
 20 25 30

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

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly
 85 90 95

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

ES 2 684 475 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a globulímero beta amiloide (20-42) que comprende:
 - una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10; y
- 5 una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 14.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste en: un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico, una inmunoglobulina con dominio variable doble y un anticuerpo biespecífico.
- 10 3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28.
4. El anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se expone en SEQ ID NO: 46 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se expone en SEQ ID NO: 48.
- 15 5. El anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se expone en SEQ ID NO: 47 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se expone en SEQ ID NO: 48.
- 20 6. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho anticuerpo comprende además un agente seleccionado a partir del grupo que consiste en: una molécula de inmunoadhesión, un agente formador de imágenes y un agente terapéutico.
7. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 7.
9. Una célula hospedadora que comprende un vector según la reivindicación 8.
- 25 10. Un método de producción de un anticuerpo que comprende cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 9 en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir el anticuerpo.
11. Un anticuerpo producido según el método de la reivindicación 10.
12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 13. La composición farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende además al menos un agente terapéutico adicional.
14. La composición farmacéutica según la reivindicación 12, en donde el anticuerpo está cristalizado.
- 35 15. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad seleccionada a partir del grupo que consiste en amiloidosis AL sistémica, amiloidosis AL nodular, amiloidosis AA sistémica, amiloidosis prostática, amiloidosis por hemodiálisis, amiloidosis visceral familiar, amiloidosis sistémica senil, amiloidosis cardíaca familiar, enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.

FIGURA 1

SEQ ID NO:1

DVVMTQX⁷PLSLPVTX¹⁵GQPASISCKSSOSLLDIDGKTYLNWX⁴¹X⁴²QX⁴⁴PGQSPX⁵⁰R
 LIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTK
 LEIKR

X ⁷ es S o T.	X ⁴¹ es F o L.	10 X ⁴⁴ es R o K.
X ¹⁵ es L o P.	X ⁴² es Q o L.	X ⁵⁰ es R o Q.

FIGURA 2

SEQ ID NO:2

EVQLVESGGGLX¹²QPGGSLRLSCAX²⁴SGFTX²⁹SSYGVHWVRQAPGKGLEWX⁴⁸X⁴⁹VI
WRGGRIDYNAAFMSRX⁶⁷TISX⁷¹DNSKX⁷⁶TX⁷⁸YLMNSLRAEDTAVYYCARNSDVW
 GQTTVTVSS

X ¹² es I o V.	X ⁴⁸ es V o L.	X ⁷¹ es R o K.
X ²⁴ es A o V.	X ⁴⁹ es S o G.	25 X ⁷⁶ es N o S.
X ²⁹ es V o L.	X ⁶⁷ es F o L.	X ⁷⁸ es L o V.

FIGURA 3

SEQ ID NO:3

X¹VQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGX²⁷SX²⁹SSYGVHWX³⁷RQPPGKGLEWX⁴⁸GVI
WRGGRIDYNAAFMSRX⁶⁷TISX⁷¹DTSKX⁷⁶QX⁷⁸SLKLSSVTAADTAVYYCARNSDVW
 GQTTVTVSS

X ¹ es Q o E.	X ⁷¹ es V o K.
X ²⁷ es G o F.	40 X ⁷⁶ es N o S.
X ²⁹ es I o L.	X ⁷⁸ es F o V.
X ³⁷ es I o V.	
X ⁴⁸ es I o L.	
X ⁶⁷ es V o L.	

FIGURA 4

SEQ ID NO:4

EVQLVESGGGLIQPGSLRLSCAASGFTVSSYGVHWVRQAPGKGLEWVSVIWRGGR
IDYNAAFMSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNSDVWGQGT(TV)SS

FIGURA 5

SEQ ID NO:5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGVHWVRQAPGKGLEWVSVIWRGG
RIDYNAAFMSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNSDVWGQGT(TV)SS

FIGURA 6

SEQ ID NO:6

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWRGG
RIDYNAAFMSRLTISKDNSKSTVYLYQMNSLRAEDTAVYYCARNSDVWGQGT(TV)SS

FIGURA 7

SEQ ID NO:7

EVQLVESGGGLIQPGSLRLSCAASGFTLSSYGVHWVRQAPGKGLEWVSVIWRGGR
IDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNSDVWGQGT(TV)SS

FIGURA 8

SEQ ID NO:8

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGRID
YNAAFMSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARNSDVWGQGT(TV)SS

FIGURA 9

SEQ ID NO:9

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGRID
YNAAFMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNSDVWGQGTTVTSS

FIGURA 10

SEQ ID NO:10

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWRGGRI
DYNAAFMSRLTISKDTSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNSDVWGQGTTVTSS

FIGURA 11

SEQ ID NO:11

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGRID
YNAAFMSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNSDVWGQGTTVTSS

FIGURA 12

SEQ ID NO:12

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLLVSK
LDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIKR

FIGURA 13

SEQ ID NO:13

DVVMTQTPLSLPVTTPGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLNWFLQKPGQSPQRLIYLLVSK
LDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIKR

FIGURA 14

SEQ ID NO:14

DVVMTQTPLSLPVTGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLLIYLVSK
LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGQGTKLEIKR

FIGURA 15

SEQ ID NO:15

DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLNWLLQKPGQSPRRLIYLVSK
LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGQGTKLEIKR

FIGURA 16

SEQ ID NO:16

DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLNWFLQKPGQSPRRLIYLVSK
LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPYTFGQGTKLEIKR

FIGURA 17

SEQ ID NO:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
23	m4D10_VH	Q	V	Q	L	K	Q	S	G	P	S	L	I	Q	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	T	S	Y	G	V
4	4D10hum_VH.1z	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	V	S	S	Y	G	V
5	4D10hum_VH.1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	V	S	S	Y	G	V
6	4D10hum_VH.1a	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	V	S	G	F	T	L	S	S	Y	G	V
7	4D10hum_VH.1b	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	S	Y	G	V
2	4D10hum_VH3 consenso	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	X	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	X	S	G	F	T	X	S	S	Y	G	V

SEQ ID NO:		35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73
23	H	W	V	R	Q	S	P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	L	S	I	T	K	D	N	
4	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	F	T	I	S	R	D	N	
5	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	F	T	I	S	R	D	N	
6	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	L	T	I	S	K	D	N	
7	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	F	T	I	S	K	D	N	
2	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	X	X	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	X	T	I	S	X	D	N	

SEQ ID NO:		74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
23	S	K	S	Q	V	F	F	K	M	N	S	L	Q	A	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S	
4	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
5	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
6	S	K	S	T	V	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
7	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
2	S	K	X	T	X	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	

FIGURA 18

SEQ ID NO:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
23	m4D10_VH	Q	V	Q	L	K	Q	S	G	P	S	L	I	Q	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	T	S	Y	G	V
8	4D10hum_VH.2z	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	S	Y	G	V
9	4D10hum_VH.2	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	S	Y	G	V
10	4D10hum_VH.2a	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	S	S	Y	G	V
11	4D10hum_VH.2b	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	F	S	L	S	S	Y	G	V
3	4D10hum_VH4 consenso	X	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	X	S	X	S	S	Y	G	V

SEQ ID NO:		35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73
23	H	W	V	R	Q	S	P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	L	S	I	T	K	D	N	
8	H	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	V	T	I	S	V	D	T	
9	H	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	V	T	I	S	V	D	T	
10	H	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	L	T	I	S	K	D	T	
11	H	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	V	T	I	S	K	D	T	
3	H	W	X	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	X	G	V	I	W	R	G	G	R	I	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	X	T	I	S	X	D	T	

SEQ ID NO:		74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
23	S	K	S	Q	V	F	F	K	M	N	S	L	Q	A	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S	
8	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
9	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
10	S	K	S	Q	V	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
11	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	
3	S	K	X	Q	X	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	S	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	

FIGURA 19

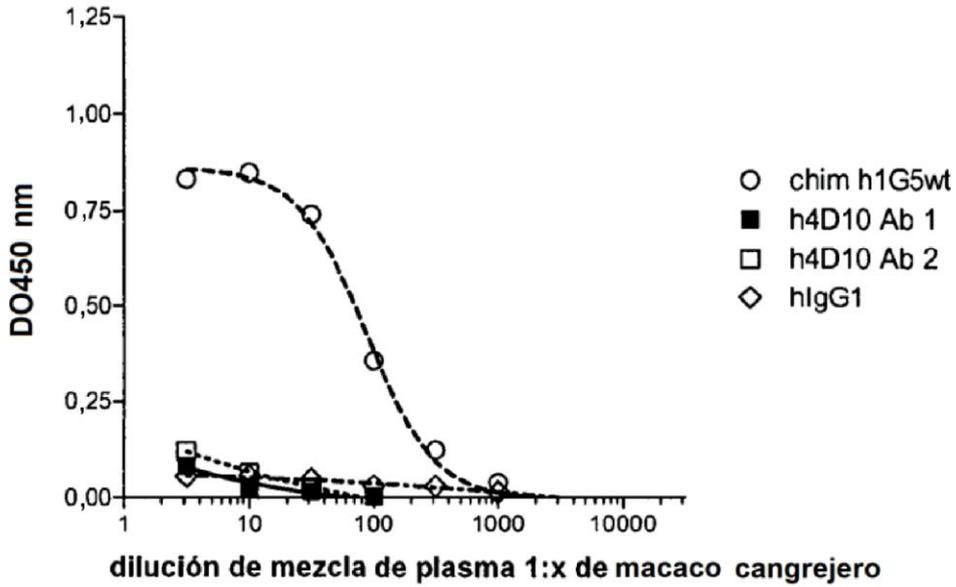
SEQ ID NO:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
24	m4D10 VL	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	T	L	S	V	T	I	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	I	D	G
12	4D10hum _Vk.1z	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	I	D	G
13	4D10hum _Vk.1	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	P	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	I	D	G
14	4D10hum _Vk.1a	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	P	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	I	D	G
15	4D10hum _Vk.1b	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	I	D	G
16	4D10hum _Vk.1c	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	I	D	G
1	4D10hum _Vk consenso	D	V	V	M	T	Q	X	P	L	S	L	P	V	T	X	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D	I	D	G

SEQ ID NO:		35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73
24		K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	R	P	G	Q	S	P	K	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G
12		K	T	Y	L	N	W	F	Q	Q	R	P	G	Q	S	P	R	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G
13		K	T	Y	L	N	W	F	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G
14		K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G
15		K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	R	P	G	Q	S	P	R	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G
16		K	T	Y	L	N	W	F	L	Q	K	P	G	Q	S	P	R	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G
1		K	T	Y	L	N	W	X	X	Q	X	P	G	Q	S	P	X	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G

SEQ ID NO:		74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
24		T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R
12		T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
13		T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
14		T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
15		T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
16		T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R
1		T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R

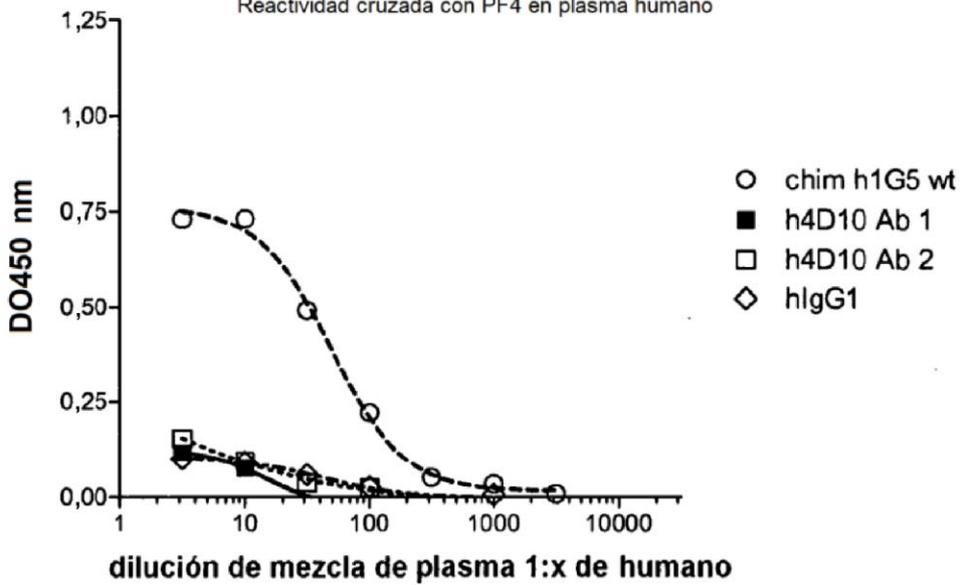
FIGURA 20

Reactividad cruzada con PF4 en plasma de macaco cangrejero



A

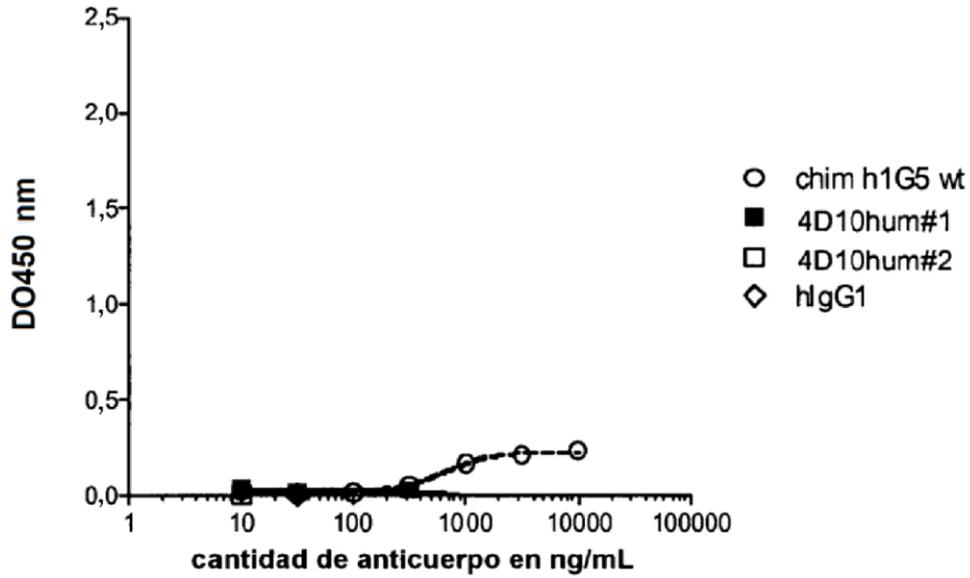
Reactividad cruzada con PF4 en plasma humano



B

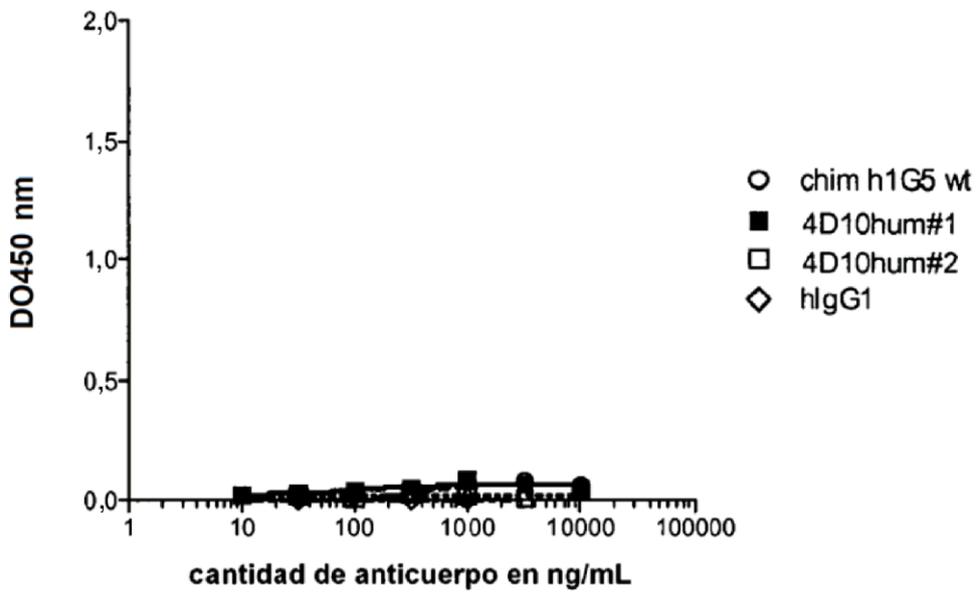
FIGURA 21

Reactividad cruzada con PF4 en plasma de macaco cangrejero



A

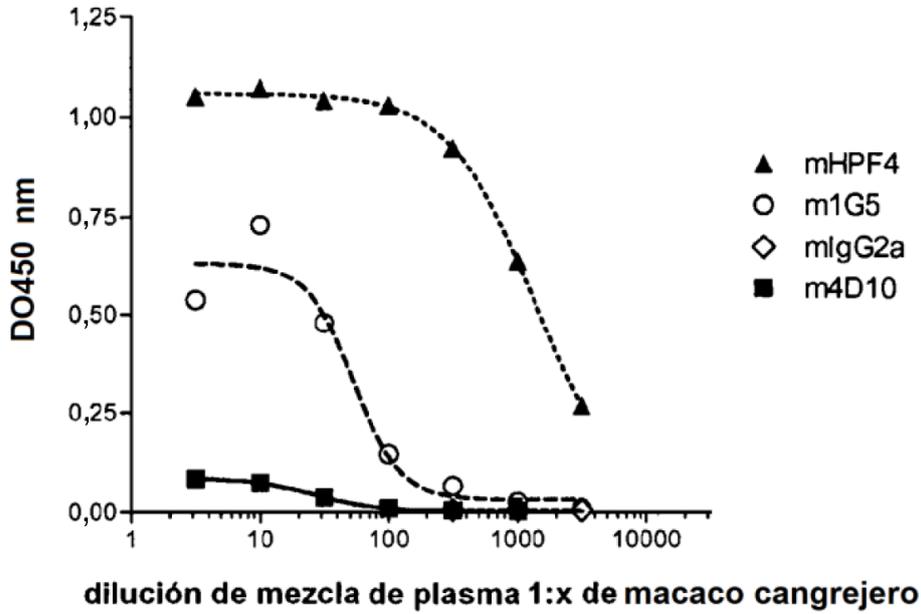
Reactividad cruzada con PF4 en plasma humano



B

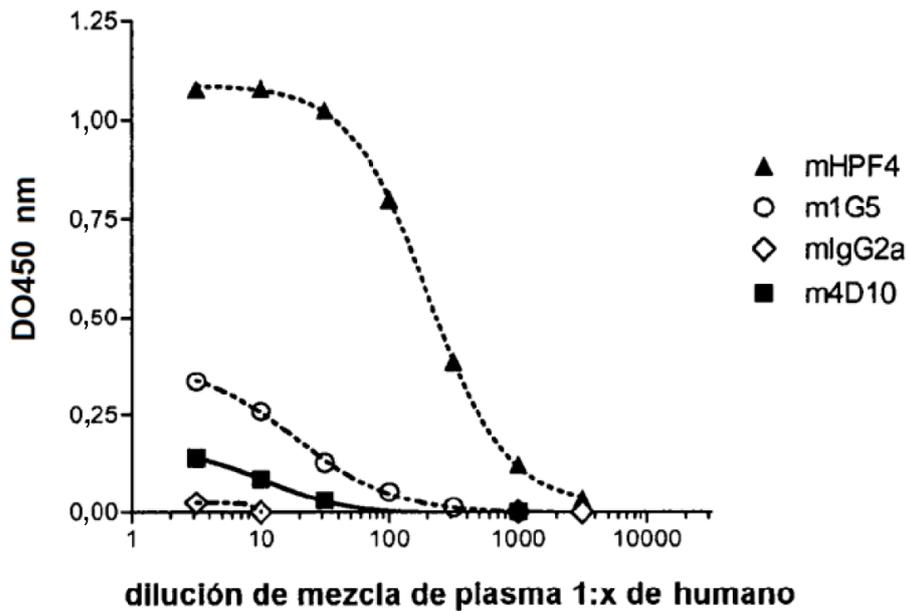
FIGURA 22

Reactividad cruzada con PF4 en plasma de macaco cangrejero



A

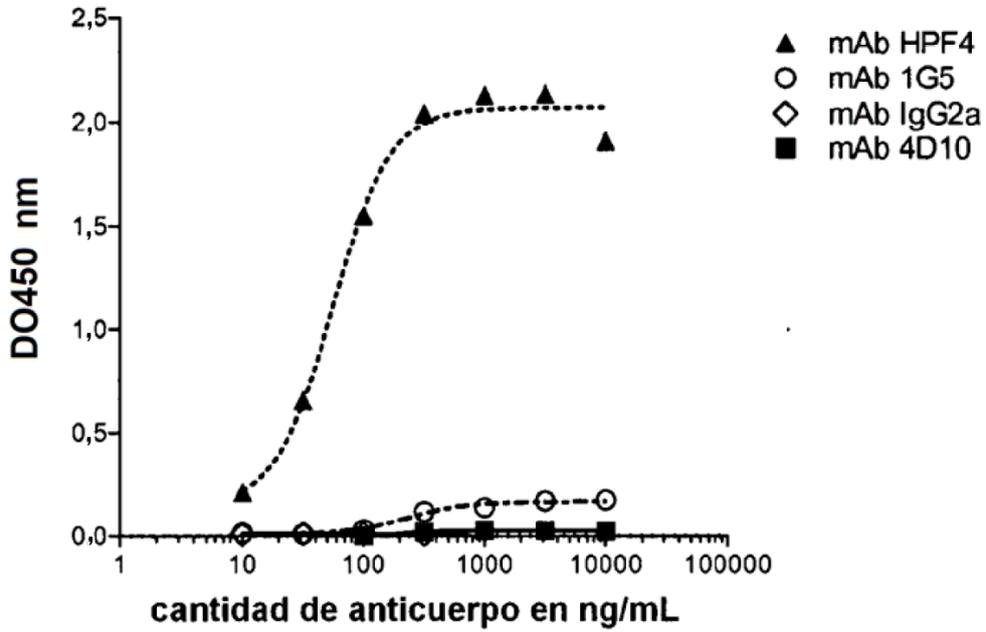
Reactividad cruzada con PF4 en plasma humano



B

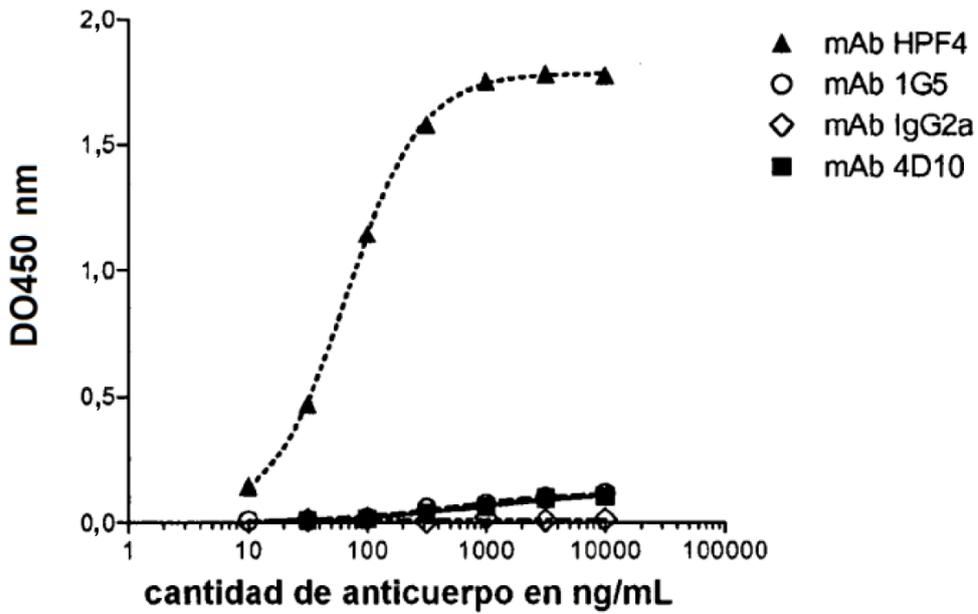
FIGURA 23

Reactividad cruzada con PF4 en plasma de macaco cangrejero



A

Reacción cruzada con PF4 en plasma humano



B

FIGURA 24

SEQ ID NO:46

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWRGG
RIDYNAAFMSRLTISKDNSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARNSDVWGQGT
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

FIGURA 25

SEQ ID NO:47

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWRGGRI
DYNAAFMSRLTISKDTSKQVSLKLSVTAADTAVYYCARNSDVWGQGT
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQS
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

FIGURA 26

SEQ ID NO:48

DVVMVTQPLSLPVTTPGQPASISCKSSQSLDIDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLLIYLVSK
LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWOQGHFPYTFGQGT
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC