

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 469**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2016** **PCT/EP2016/066516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017** **WO17009327**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2016** **E 16739087 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025** **EP 3322726**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a la sortilina e inhiben la unión de la progranulina**

30 Prioridad:

13.07.2015 GB 201512215

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

04.06.2025

73 Titular/es:

**H. LUNDBECK A/S (100.00%)
Ottiliavej 9
2500 Valby, DK**

72 Inventor/es:

**BIILMANN RØNN, LARS, CHRISTIAN;
MALIK, IBRAHIM, JOHN;
STAVENHAGEN, JEFFREY, B.;;
CHRISTENSEN, SØREN;
EGEBJERG, JAN;
GERRITSEN, ARNOUT;
VAN DEN BRINK, EDWARD;
PARREN, PAUL y
DE JONG, ROB**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 3 024 469 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se unen a la sortilina e inhiben la unión de la progranulina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-Sortilina útiles para corregir un nivel deficiente de progranulina (PGRN). En particular, estos anticuerpos pueden utilizarse en el tratamiento de la demencia frontotemporal (DFT) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Además, anticipó que los anticuerpos monoclonales también podrían ser útiles para tratar trastornos neurodegenerativos tal como la enfermedad de Alzheimer (EA).

Referencia al listado de secuencias

10 La presente solicitud incluye uno o más Listados de Secuencias de conformidad con el 37 C.F.R. 1.821 y siguientes, que se divulgan en soportes legibles por ordenador (nombre del archivo: 0993_ST25.txt, creado el 22 de diciembre de 2016, y que tiene un tamaño de 144 kB), archivo que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención

15 La sortilina es un receptor que se ha descrito como mediador de los efectos pro-apoptóticos de las pro-neurotrofinas y mediador del tráfico y la clasificación de los receptores de neurotrofinas (Nykjaer et al, 2012, Trends Neurosci. 2012;35(4):261-70; Glerup et al, Handb Exp Pharmacol, 2014;220:165-89, Carlo et al, J Mol Med (Berl). 2014 Sep;92(9):905-11). Se han identificado varios ligandos de sortilina incluyendo neurotensina para la que se localizó un sitio de unión de alta afinidad mediante cristalografía de rayos X en el interior de un túnel de hélice beta en la molécula de sortilina (Quistgaard et al, Nat Struct Mol Biol. Enero de 2009; 16(1):96-8; Quistgaard et al, Protein Sci. Septiembre de 2014;23(9):1291-300). Más recientemente, se ha demostrado que la sortilina funciona como un receptor de alta afinidad para el factor de crecimiento progranulina (PGRN, Hu et al. Neurona. 18 de noviembre de 2010;68(4):654-67.

25 La PGRN ((proepitelina, precursor de la granulina-epitelina, factor de crecimiento derivado de células PC, acrogranina)) es una proteína glicosilada secretada con acciones antiinflamatorias y neurotróficas (para una revisión reciente, véase Nguyen, Trends Endocrinol Metab. 2013 dic;24(12):597-606). PGRN se escinde de manera proteolítica para dar granulinas, pero queda mucho por aprender con respecto al papel fisiológico de PGRN y las granulinas y la identidad de sus receptores. Se ha implicado a la PGRN en varias funciones celulares, como la regulación del ciclo celular y la motilidad celular (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 57:600-612 (2003); Monami, G., et al., Cancer Res. 5(5:7103-7110 (2006)), reparación de heridas, inflamación (Zhu, J., et al., Cell 777:867-878 (2002)), inducción de factores de crecimiento tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Tangkeangsimsin, W. & Serrero, G, Carcinogenesis 25.1587-1592 (2004)), y tumorigénesis (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81:600- 612 (2003), Monami, G., et al., Cancer Res 5(5:7103-7110 (2006); Serrero, G., Biochem Biophys. Res. Commun. 505-409-413 (2003), Lu, R & Serrero, G., Proc. Natl Acad Sci U.S.A 98 142-147 (2001); Liao, L M., et al., Cancer Res. 60:1353-1360 (2000)). Se ha informado de que PGRN se une al receptor del TNF (Tang W et al., Science 2011, 332(6028):478-84). pero esta observación ha sido cuestionada por otros (Chen et al., J Neurosci. 2013, 33(21):9202-9213).

40 La unión de la PGRN a la sortilina se ha mapeado en el sitio de la neurotensina y se ha informado que está mediada únicamente a través del dominio C-terminal de la PGRN (Zheng et al. PLoS One. 2011;6(6):e21023; Lee et al. Hum Mol Genet. 2013) de forma similar a la neurotensina y, de acuerdo con ello, se ha demostrado que la neurotensina bloquea la interacción de la sortilina con la PGRN y otros ligandos. Tras la unión, la sortilina media la eliminación lisosomal de PGRN y, por tanto, regula los niveles extracelulares de PGRN (Hu et al.). 2010). Así, se ha demostrado que el knockdown o la sobreexpresión de sortilina regulan los niveles extracelulares de PGRN en cultivo celular (Carrasquillo et al. Am J Hum Genet. 2010 dic 10;87(6):890-7) y en ratones, se informó que la deficiencia de sortilina aumenta los niveles de PGRN y restaura los niveles de PGRN en plasma y cerebro en ratones PGRN +/- (Hu et al.). 2010). Curiosamente, un polimorfismo de nucleótido único (SNP) cerca de sortilina se asoció con una disminución de PGRN en plasma y un aumento de los niveles de ARNm de sortilina (Carrasquillo et al. Am J Hum Genet. 2010 dic 10;87(6):890-7). Estas observaciones sugieren que la sortilina es un regulador clave de PGRN extracelular.

50 La PGRN se ha relacionado con la demencia frontotemporal (DFT), una demencia progresiva caracterizada por cambios conductuales y semánticos, así como degeneración lobar frontotemporal (DLFT) e inclusiones neuronales que contienen la proteína de unión al ADN TAR-43 (TDP-43) o inclusiones tau (Baker et al, 2006, Nature. 2006 Ago 24;442(7105):916-9; Cruts et al, Nature 442: 920-924 (2006); Am J Hum Genet. 2010 Dic 10;87(6):890-7, M et al, Trends in Genetics 24: 186-194 (2008)). La mayoría de los casos esporádicos y familiares de DFT muestran una patología TDP-43 (~50%) similar a la ELA y la DFT-TDP43 y la ELA son consideradas por algunos como un espectro de la enfermedad (Ito D Neurology. 2011 Oct 25;77(17):1636-43; Boxer AL et al, Alzheimers Dement. 2013 Mar;9(2):176-88; Rademakers et al, Nat Rev Neurol. 2012 Agosto; 8(8): 423-434) debido a patologías comunes y factores genéticos y a cierto solapamiento en la sintomatología. No se dispone de opciones de tratamiento de modificación de enfermedad para DFT. Un subconjunto de pacientes con demencia frontotemporal con patología

por TDP-43 tiene mutaciones de pérdida de función en el gen de granulina (GRN) que dan como resultado una haploinsuficiencia en PGRN. Hasta la fecha, se han asociado con DFT 69 mutaciones diferentes en el gen de granulina, que dan todas como resultado función y/o niveles reducidos de PGRN y se cree que elevar la PGRN extracelular en plasma y cerebro contrarrestará el proceso patológico.

Las mutaciones de PGRN también se han relacionado con la enfermedad de Alzheimer (EA) (Sheng et al., 2014, *Gene*. 2014 Jun 1;542(2):141-5; Brouwers et al., 2008, *Neurology*. 2008 Aug 26;71(9):656-64), lo que sugiere que la deficiencia de PGRN puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de la EA. Además, se han observado efectos neuroprotectores de PGRN en modelos de EA de ratón (Minami *et al*, 2014, *Nat Med*. Octubre de 2014; 20(10):1157-64) proporcionando respaldo para la opinión de que PGRN potenciada puede ser beneficiosa en EA y posiblemente otros estados neurodegenerativos.

La presente solicitud describe la generación e identificación de anticuerpos anti Sortilina humana que pueden regular la PGRN en modelos celulares y en ratones. Esos anticuerpos se unen de manera sorprendente a una región en la sortilina que está alejada del sitio de unión a progranulina notificado previamente, el denominado sitio de neurotensina, y aún pueden inhibir la interacción sortilina-PGRN y aumentar de ese modo la PGRN extracelular.

Los inventores han definido seis regiones de unión a Sortilina y, sorprendentemente, han identificado que los anticuerpos más eficaces se unen a una región ("región D"). Dado que la PGRN tiene efectos neuroprotectores y antiinflamatorios, los hallazgos de los inventores indican que es probable que tales anticuerpos dirigidos contra la Sortilina tengan un efecto beneficioso en el tratamiento de una serie de trastornos neurodegenerativos, incluida la DFT/DLFT. Un subgrupo de estos pacientes porta una mutación en el gen que codifica para PGRN que conduce a haploinsuficiencia. Por tanto, es probable que los anticuerpos frente a sortilina tengan beneficios terapéuticos similares para pacientes que padecen otras proteinopatías TDP-43 y enfermedades en las que los niveles de PGRN pueden influir en la función y patología por TDP43, incluyendo ELA y EA.

Sumario de invención

La invención se describe en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones o aspectos no comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones se incluyen únicamente a título de referencia. Cualquier referencia a métodos de tratamiento se considera una referencia a los compuestos y composiciones de la presente invención para su uso en un método de tratamiento practicado en el cuerpo humano/animal. Los inventores de la presente invención han generado anticuerpos monoclonales que son capaces de inhibir la unión de PGRN a Sortilina, y que sorprendentemente se unen a una nueva región de Sortilina denominada la "región D" como se define en **la SEQ ID NO:170**. Varios anticuerpos identificados por los inventores tienen propiedades similares a las de los anticuerpos frente a la región D y pruebas experimentales indican que también se unen dentro de la región D, y esos anticuerpos se denominan en el presente documento anticuerpos D+. En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a tales anticuerpos, a composiciones y/o kits que comprenden tales anticuerpos, y a métodos y usos de los mismos.

La invención también se refiere a un método de prevención o tratamiento de una enfermedad asociada con niveles disminuidos de PGRN en el cerebro de un paciente, que comprende la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la región D de Sortilina. Estas enfermedades incluyen, entre otras DFT, ELA y proteinopatías TDP43 tal como la EA.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una visión general de la generación de la asignación de regiones de anticuerpos humanos basada en la unión de regiones de Sortilina, el efecto sobre la unión a PGRN y los niveles de PGRN y sobre el bloqueo cruzado entre los anticuerpos.

Los anticuerpos de unión a Sortilina se seleccionaron y asignaron a las regiones A-E basándose en la unión a las construcciones de lanzadera en las que la secuencia correspondía a la secuencia tetraodon Sortilina dentro de las regiones seleccionadas de la proteína (**Ejemplo 1, Figura 2**).

Se seleccionaron 20 anticuerpos que inhibían la unión Sortilina-PGRN (medida mediante análisis HTRF) (véase **Ejemplo 10, Figura 5 y Figura 6**). 15 de estos anticuerpos eran anticuerpos frente a la región D mientras que 3 eran anticuerpos D+ (**figura 6**). El análisis de bloqueo cruzado posterior mostró que los 18 anticuerpos D+ y frente a la región D (los anticuerpos D+ tienen un patrón de unión a los constructos lanzadera diferente de los anticuerpos frente a la región D. Sin embargo, los anticuerpos D+ no pueden asignarse con certeza a una región de unión A-E como se ha indicado anteriormente, sino que compartían características funcionales (ensayos celulares, etc.) similares a los anticuerpos de la región D), todos se bloqueaban de forma cruzada entre sí, lo que apoya que interaccionaban con la misma región de Sortilina (**Ejemplo 9, Figura 7**). Cuando se sometieron a prueba anticuerpos frente a sortilina de otras clases de región en el ensayo de unión a sortilina de PGRN mediante HTRF, sólo dos de 41 anticuerpos presentaron un efecto inhibitorio. Uno de estos dos anticuerpos se bloqueó de manera cruzada con los D y D+, pero tuvo un patrón de unión a constructos lanzadera atípico (similar a D excepto que se unió a la región hB01-05), mientras que el otro anticuerpo no se bloqueó de manera cruzada con los otros

anticuerpos que inhibieron la unión a sortilina de PGRN, respaldando por tanto la conclusión de que se une a otra región de sortilina.

Estas observaciones muestran que los anticuerpos que se unen a un área de sortilina definida por la región D tienen el potencial de inhibir la unión sortilina-PGRN.

- 5 19 anticuerpos de bloqueo cruzado, de los cuales 18 eran anticuerpos de la región D y D+, aumentaron la PGRN extracelular en un ensayo celular (**Ejemplo 13, Figura 10 y Figura 11**). Tres de estos anticuerpos se probaron in vivo y se descubrió que aumentaban la PGRN plasmática (**Figura 13, Ejemplo 15**).

10 Los recuadros de la **Figura 1** ilustran los pasos en la selección de anticuerpos. A-E se refieren a las regiones a las que se asignaron los respectivos anticuerpos de unión a Sortilina basándose en construcciones de lanzadera como se describe en **Ejemplo 1 y la SEQ ID NOs:171-179**. "Otro" se refiere a un anticuerpo que no ha podido asignarse a una región y que puede unirse en la interfaz entre las regiones A y B. Tet se refiere a anticuerpos que se unen también a sortilina de *Tetraodon*.

15 Además de los anticuerpos humanos mostrados, se generó y caracterizó de forma similar un conjunto de anticuerpos sortilina antihumanos de ratón. Dos de estos anticuerpos se asignaron a la región D y mostraron que se bloqueaban de manera cruzada con anticuerpos D+ y frente a la región D humana, para inhibir la unión a sortilina de PGRN y para aumentar la PGRN extracelular (véase la **figura 4**).

La **Figura 2** muestra la asignación de regiones de los anticuerpos basada en la unión a las construcciones de lanzadera Sortilina.

20 El **panel A** muestra una ilustración lineal de las construcciones de lanzadera utilizadas para la asignación de regiones de anticuerpos como se describe en **Ejemplo 1**. Se generaron construcciones de lanzadera Sortilina basadas en la secuencia de Sortilina humana (la **SEQ ID NO:169**) (secciones representadas en gris) en las que se intercambiaron residuos de aminoácidos por el aminoácido correspondiente de la secuencia de Sortilina de tetraodón (representada en negro) (la **SEQ ID NO:173**) (**Ejemplos 1-3**).

25 El **panel B** muestra la estructura predicha de las construcciones de lanzadera ilustradas linealmente en A. Los residuos oscuros indican los residuos cambiados a la secuencia tetraodón correspondiente en las construcciones de lanzadera.

30 El **panel C** ilustra el patrón de unión de los anticuerpos asignados a las clases de la región D y la región E, respectivamente. A "+" indica que se está vinculado a una determinada construcción de lanzadera y a "-" indica que no se está vinculado. Basándose en el patrón de unión a los diferentes constructos lanzadera, se asignaron los anticuerpos a las regiones. Las clases de regiones de anticuerpos resultantes se indican con A-E. Para los anticuerpos de las regiones D y E ilustrados, ambos se unieron a las secuencias humanas (todas grises) como se indica con "+" y ninguno se unió a la secuencia tetraodón (todas negras) como se indica con "-", mientras que el anticuerpo de la región E se unió a la construcción de lanzadera hB45678 mientras que el anticuerpo de la región D no se unió, lo que dio como resultado la localización de la unión como se ilustra en el panel A. Para los anticuerpos de la región D, se observó la unión a las siguientes regiones de lanzadera: hsort, hB06-10, B12390. Los anticuerpos no se unieron a hB01-05, B45678, tet. Para anticuerpos D+, se observó unión a la siguiente región lanzadera: hsort, B12390. Los anticuerpos no se unieron a hB01-05, hB06-10, B45678, tet. El patrón de unión a F fue similar al patrón de unión a D excepto porque no se observó unión a hB06-10 para los anticuerpos D+.

40 Los anticuerpos no se unieron a la proteína Sortilina completamente tetraodón, excepto dos. Los dos anticuerpos capaces de unirse a la secuencia tetraodón se denominaron "tet". "Otros" se refiere a un anticuerpo que no ha podido asignarse a una región.

45 La **figura 3** muestra las afinidades de unión de los anticuerpos humanos de la región D y D+. Afinidades de unión a constructos lanzadera de sortilina mediante interferometría de biocapa usando Octet 384RED tal como se describe en el **ejemplo 8** (CE50, ng/ml). La ausencia de sombreado indica una CE50 de 0.1-10 ng/ml, un sombreado de color gris claro indica una CE50 >10 ng/ml y un sombreado de color gris indica ausencia de unión (NB). La asignación de regiones se basó en patrones de unión se ilustra en la **Figura 2**. Las construcciones de lanzadera se ilustran en la **Figura 2** y las secuencias se indican en la **SEQ ID NOs:171-179**. mAb = anticuerpo monoclonal.

50 **Figura 4** muestra las afinidades de unión de anticuerpos antihumanos de ratón a construcciones de lanzadera Sortilina obtenidas mediante interferometría de biocapa utilizando Octet 384RED como se describe en **Ejemplo 8** (EC50, ng/ml). La ausencia de sombreado indica unión y el sombreado gris indica ausencia de unión (NB). La asignación de regiones basada en patrones de unión se ilustra en la **Figura 2**.

55 La **Figura 5** muestra el efecto del anticuerpo Sortilina sobre la unión Sortilina PGRN. El anticuerpo 45 monoclonal humano (AcMhu) frente a la región D de sortilina (círculos rellenos) impidió la unión de PGRN a sortilina, en contraposición a un anticuerpo frente a la región E de sortilina de control (triángulos rellenos) y un control de IgG, IgG1-b12 (triángulos en blanco) que no interfirieron en la unión. Se determinó la unión de anticuerpos midiendo el

desplazamiento de la unión de PGRN a sortilina usando fluorescencia homogénea con resolución temporal (HTRF) (**ejemplo 10**). Se realizó la evaluación de dosis-respuesta de anticuerpos con diez concentraciones que cubrían de 50 pM a 1 μ M en una curva de dilución de 3 veces. Se calcularon los valores de concentración inhibidora mitad de la máxima (CI50) mediante regresión no lineal usando respuesta de concentración sigmoidea (pendiente variable) en XLfit 4 (IDBS, R.U.).

Figura 6 Resumen del efecto de los anticuerpos sobre la unión Sortilina-PGRN determinado mediante análisis de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) como se muestra en la **Figura 5**. En total, se sometieron a prueba 62 anticuerpos, se encontró que 15 anticuerpos frente a la región D y 3 anticuerpos D+ inhibían la unión a sortilina de PGRN y se determinaron los valores de CI50. Para dos anticuerpos adicionales (E y otras regiones), se observó un efecto inhibitor. Todos los anticuerpos restantes fueron negativos en la prueba. * Anticuerpo demasiado débil para ajustarse a una curva dosis-respuesta. 6% de inhibición a 1 μ M. ** anticuerpo de control (ctrl) demasiado débil para disparar una curva dosis-respuesta. 37% de inhibición a 1 μ M.

Estas observaciones muestran que los anticuerpos de sortilina caracterizados por su asignación a la región D o D+ inhiben la unión de sortilina a PGRN directamente y son capaces de inhibir la unión sortilina-PGRN.

La figura 7 muestra el bloqueo cruzado entre anticuerpos. Se sometieron a prueba todos los anticuerpos humanos y los anticuerpos de ratón en un solo experimento en el que se unió cada anticuerpo a sortilina humana de tipo natural (WT) (**figura 7**). Posteriormente, se sometieron a prueba todos los otros anticuerpos para determinar la unión al complejo sortilina:anticuerpo formado previamente (**ejemplo 9**). Los 15 anticuerpos frente a la región D y 3 anticuerpos D+ humanos seleccionados (basándose en su efecto en el ensayo de PGRN-sortilina mediante HTRF, (**figura 5** y **figura 6**) y dos anticuerpos frente a la región D de ratón inhibieron todos la unión de unos y otros a sortilina humana WT.

Los anticuerpos no presentaron bloqueo cruzado con anticuerpos designados a otras clases de regiones (como se ilustra para los anticuerpos que reconocen la región A, la región E y el tetraodón numerados AbA1-x, AbE1-x y Abtet en la tabla, respectivamente), excepto un anticuerpo de la región A con bloqueo cruzado, un anticuerpo con asignación de región desconocida ("otro") y un bloqueo parcial para un anticuerpo D+ 548. Estos datos respaldan que los anticuerpos D+ y frente a la región D que pueden inhibir la unión a sortilina de PGRN en el ensayo mediante HTRF interaccionan todos con la misma región en sortilina.

El bloqueo cruzado entre anticuerpos de Sortilina de la misma región o de regiones diferentes (regiones basadas en la unión a construcciones de lanzadera como se ilustra en la **Figura 2**) se determinó analizando la interferencia con la unión anticuerpo-Sortilina. Se midió la unión de anticuerpos a sortilina-ECD-His mediante interferometría de biocapa usando Octet 384RED (**ejemplo 9**). La columna a la izquierda indica anticuerpos primarios (inmovilizados) y la fila superior indica los anticuerpos secundarios (anticuerpos que están sometidos a prueba frente a los anticuerpos inmovilizados). La unión de los anticuerpos tanto primarios como secundarios a sortilina-ECD-His daría como resultado un valor de respuesta mayor de 0.1 e indicaría que ambos anticuerpos se unían a diferentes regiones de la proteína. Un valor de respuesta menor de 0.1 muestra falta de unión del anticuerpo secundario y un bloqueo cruzado eficaz por el anticuerpo inmovilizado (primario), lo que sugiere que ambos anticuerpos se unen a la misma región de sortilina.

La Figura 8 muestra el efecto de los anticuerpos de Sortilina de región D y D+ sobre la unión del ligando selectivo de molécula pequeña AF38469 a Sortilina. Se ha demostrado que el sitio de unión del AF38469 es similar al sitio de unión de la neurotensina y se ha caracterizado mediante cristalografía de rayos X (Schröder et al. Bioorg Med Chem Lett. 1 de enero de 2014;24(1):177-80). Se ha informado que PGRN se une al mismo sitio (Lee et al. Hum Mol Genet. 2013) los anticuerpos 45 y 68, que se unen a la región D y D+ respectivamente, no inhibieron la unión de AF38469 a la sortilina. Estos datos sugieren que estos anticuerpos tienen un sitio de unión para sortilina distinto del sitio de unión para AF38469. Por tanto, los anticuerpos 45 y 68 inhiben la unión a PGRN de sortilina a través de un sitio de unión distinto del hasta la fecha supuesto sitio de unión a PGRN en sortilina.

Figura 9 Efecto de los anticuerpos 45 y 68 sobre la unión celular y la endocitosis de PGRN (**Ejemplo 12**). Los anticuerpos 45 y 68 inhibieron la unión y/o endocitosis de PGRN por células que sobreexpresaban sortilina. La adición de neurotensina (NT, 10 μ M) redujo de manera similar la unión o endocitosis de PGRN tal como se refleja en fluorescencia reducida tal como se esperaba mientras que el anticuerpo B12 de control de isotipo no influyó en los niveles de fluorescencia de PGRN.

Los anticuerpos (100nM) a ensayar se añadieron a las células S18 30 min antes de la adición de PGRN recombinante durante 4 h. Entonces se fijaron las células, se tiñeron para determinar PGRN y se analizaron mediante Celloomics. Se midió la fluorescencia de PGRN como fluorescencia media por célula. Se presentan los datos como la media \pm D.E. Los datos se analizaron mediante Anova unidireccional seguido del análisis de Dunnett; todos los grupos se compararon con PGRN. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 10 Niveles extracelulares de PGRN estimados por ELISA en medios procedentes de cultivos de células HEK sobreexpresantes de sortilina (S18). Los anticuerpos D+ (68) y frente a la región D (45, 811) de sortilina aumentaron los niveles de PGRN y se observó un efecto similar del ligando de sortilina, neurotensina mientras que

el anticuerpo B12 de control no tuvo ningún efecto. Estas observaciones indican que los anticuerpos frente a sortilina para la región D y D+ podían inhibir el aclaramiento mediado por sortilina de PGRN, aumentando de ese modo la PGRN extracelular. Se sometieron a prueba todos los anticuerpos a 100 nM. Se sometió a prueba la neurotensina a 10 μ M. Los niveles de PGRN se han normalizado con respecto al control. Se presentan los datos como la media \pm D.E. Los datos se analizaron mediante Anova unidireccional seguido del análisis de Dunnett; todos los grupos se compararon con CTRL * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (**Ejemplo 13**).

La figura 11 muestra el efecto de los anticuerpos sobre la PGRN extracelular en células HEK humanas sobreexpresantes de Sortilina medido mediante ELISA como se describe en el **ejemplo 13**. Todos los anticuerpos frente a la región D seleccionados y los tres anticuerpos D+ seleccionados aumentaron la PGRN extracelular. Se analizaron los niveles de PGRN igual que anteriormente. Los niveles de PGRN se normalizan con respecto a controles no tratados y se facilitan en %. Dos anticuerpos fueron criados en ratón contra Sortilina humana (1F2F4 & 5E1F6) y el resto son anticuerpos humanos. Ac= anticuerpo monoclonal.

Figura 12 (Paneles superior e inferior) muestra el efecto del anticuerpo Sortilina sobre PGRN extracelular en células iPSC diferenciadas neuronalmente (**Ejemplo 14**). El anticuerpo frente a la región D de sortilina 45 y el anticuerpo D+ 68 aumentaron los niveles de PGRN mientras que los anticuerpos de control B12 y anti-HEL no tuvieron ningún efecto.

Las células iPSC diferenciadas neuronalmente se colocaron en placas de 96 pocillos. Una semana después, se añadieron anticuerpos a las células. Los medios de las células se recogieron a las 48 o 96 horas y se analizaron mediante ELISA de PGRN humano (Enzo Life sciences) y las muestras se analizaron según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos frente a sortilina humana 45 y 68 aumentaron los niveles de PGRN en los medios en ambos puntos de tiempo. Los anticuerpos de isotipo de control B12 y anti-Hel (control negativo) no cambiaron la PGRN extracelular. Se presentan los datos como la media \pm D.E. Los datos se analizaron mediante Anova unidireccional seguido del análisis de Dunnett * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (**Ejemplo 14**).

Figura 13 (Paneles A-C) muestra los niveles plasmáticos de PGRN en ratones knock in (KI) que expresan Sortilina humana tratados con anticuerpo humano de Sortilina (**Ejemplo 15**). El anticuerpo frente a sortilina 45 aumentó los niveles de PGRN en plasma mientras que el anticuerpo de control no tuvo ningún efecto.

Un estudio temporal: Se observaron niveles de PGRN en plasma aumentados después de la inyección de anticuerpo 45 (región D). Se les inyectó a los ratones anticuerpo 45 (n=5) o control (n=3) por vía s.c. a una dosis de 10 mg/kg. Se sacrificó cada grupo en diferentes puntos de tiempo. En ratones tratados con anticuerpos de control (anti-Hel) no hubo cambio en la PGRN en plasma, mientras que en ratones tratados con 45 hubo un aumento gradual en los niveles de PGRN. El efecto pareció alcanzar un máximo entre 24 y 48 h y disminuyó gradualmente en el día 4-7.

B Estudio subcrónico: Se trataron ratones dos veces a la semana con 10 mg/kg de anticuerpo 45 y de control (anti-Hel). Se recogieron muestras de sangre de la mejilla cada semana. La PGRN en plasma estaba elevada en la semana 1 y permaneció aproximadamente al mismo nivel a lo largo de todo el estudio en comparación con los animales tratados con anticuerpo de control (n=20).

C Estudio dosis-respuesta: Se inyectaron diferentes dosis (4 dosis: 0.1, 0.4, 2 y 10 mg/kg) de los anticuerpos frente a sortilina (45) y de control (anti-Hel) y se sacrificaron los ratones en el día 2. La PGRN en plasma estaba elevada en ratones tratados con 45 (10 y 2 mg/kg). Menores dosis (0.4 y 0.1 mg/kg) no tuvieron un efecto sobre la PGRN en plasma. Se presentan los datos como la media \pm D.E. Los datos se analizaron mediante Anova de dos vías seguido del análisis de Bonferroni * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (**Ejemplo 15**).

La figura 14 proporciona una ilustración de las regiones de sortilina, basadas en construcciones de lanzadera Sortilina, impuestas sobre la estructura de sortilina predicha. Las regiones constituyen las secciones de la proteína sortilina en la que el cambio de residuos de aminoácido seleccionados de la secuencia humana a la secuencia de *Tetraodon* inhibió la unión para anticuerpos de esa clase de región. La flecha indica el sitio de unión de alta afinidad notificado de neurotensina y PGRN (Quistgaard Nat Struct Mol Biol. Enero de 2009;16(1):96-8, Lee *et al*, Hum Mol Genet. 2013).

Figura 15a (Paneles 1-6) y 15b (Paneles 1-3) Muestra péptidos representativos que cubren el epítipo conformacional del anticuerpo 45, 68 y 811. Todos los péptidos mostrados muestran una protección frente al intercambio mayor de 0.5 D, excepto el péptido 115-125. El péptido 115-125 es un ejemplo de un péptido que no se ve afectado por la presencia de los anticuerpos 45, 68 u 811, y de ese modo no forman parte del péptido de unión conformacional (**ejemplo 16**)

Figura 16a (Paneles 1-6) y 16b (Paneles 1-3) muestra péptidos representativos que cubren el epítipo conformacional del anticuerpo 30. Todos los péptidos mostrados muestran una protección frente al intercambio mayor de 0.5 D, excepto el péptido 563-572, el péptido 646-656 y el péptido 704-714. Estos tres péptidos son ejemplos de péptidos que no se ven afectados por la presencia del anticuerpo 30, y por lo tanto no forma parte de la unión conformacional (**Ejemplo 16**)

La figura 17 muestra una ilustración de la microdiálisis para el procedimiento.

La figura 18a muestra un curso temporal: efecto de la administración sistémica del anticuerpo 45 o PBS (50 mg/kg, 10 ml/kg, s.c.). 24h antes de los experimentos de microdiálisis sobre los niveles de PRGN en el hipocampo de ratones hSORT1 en movimiento libre a lo largo del tiempo (24h). (Ejemplo 17)

- 5 La Figura 18b muestra los resultados de una diálisis agrupada de 24h: PRGN basal en el hipocampo de ratones hSORT1 en movimiento libre en ratones tratados con mab#45 y PBS, 3.3 ± 0.3 ng/ml y 1.1 ± 0.1 ng/ml, respectivamente, según se evaluó mediante microdiálisis push-pull (Ejemplo 17).

- 10 La Figura 18c presenta una tabla que muestra los niveles de PRGN (medias \pm SEM) en el hipocampo de ratones hSORT1 en movimiento libre medidos cada 2h durante 24h, 1d después de que los animales fueran tratados con mab#45 (n= 10) o PBS (n=8) (Ejemplo 17).

Descripción detallada de la invención

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "Sortilina" es sinónimo de la proteína Sortilina (identificada, por ejemplo, en UniProt como Q99523, 1 y 2). La numeración de aminoácidos de sortilina se proporciona con respecto a SEQ ID NO:169 tal como se muestra a continuación, siendo Met el aminoácido 1:

```
MERPWGAADG LSRWPHGLGL LLLQLQLPPS TLSQDRLDAP PPPAAPLPRW
SGPIGVSWGL RAAAAGGAFF RGGRWRRSAP GEDEECGRVR DFVAKLANNT
HQHVFDLRLG SVLSWVGDS TGVILVLTTF HVPLVIMTEG QSKLYRSEDY
GKNFKDITDL INNTFIRTEF GMAIGPENSG KVVLTAEVSG GSRGGRIFRS
SDFAKNFVQT DLPFHPLTQM MYSPQNSDYL LALSTENGLW VSKNFGGKWE
EIHKAVCLAK WGSNTTIFFT TYANGSCKAD LGALELWRTS DLGKSFKTIG
VKIYSFGLGG RFLFASVMAD KDTTRRIHVS TDQGDWTSMA QLPSVGQEQF
YSILAANDDM VFMHVDEPGD TGEFTIFTSD DRGIVYSKSL DRHLYTTTGG
ETDFTNVTSL RGVYITSVLS EDNSIQTMIT FDQGGRWTHL RKPENSECDA
TAKNKNECSL HIHASYSISQ KLNVPMAPLS EPNAVIGIVIA HGSVGDAISV
MVPDVYISDD GGYSWTKMLE GPHYTYILDS GGIIVAIEHS SRPINVIKFS
TDEGQCWQTY TFTRDPIYFT GLASEPGARS MNISIWGFTS SFLTSQWVSY
TIDFKDILER NCEEKDYTIW LAHSTDPEY EDGCILGYKE QFLRLRKSSV
CQNGRDYVVT KQPSICLCSL EDFLCDFGY RPENDSKCVE QPELKGHDLE
FCLYGREEHL TTNGYRKIPG DKCQGGVNPV REVKDLKKKC TSNFLSPEKQ
NSKSNSVPII LAIVGLMLVT VVAGVLIVKK YVCGGRFLVH RYSVLQQHAE
15 ANGVDGVDAL DTASHTNKG YHDDSDLDLE
```

Como se usa en el presente documento, el término "Región D" pretende referirse a la región en Sortilina (correspondiente a los residuos 523-610 de la SEQ ID NO:169) que consiste en los aminoácidos en la SEQ ID NO:170 como se muestra a continuación:

```
HYTYILDSGG IIVAIEHSSR PINVIKFSTD EGQCWQTYTF TRDPIYFTGL
ASEPGARSMN ISIWGFTESF LTSQWVSYTI DFKDILER
```

- 20 Para los anticuerpos de la región D, se observó la unión a las siguientes regiones de lanzadera: hsort, hB06-10, B12390. Los anticuerpos no se unieron a hB01-05, B45678, tet. Para anticuerpos D+, se observó unión a las siguientes regiones lanzadera: hsort, B12390. Los anticuerpos no se unieron a hB01-05, hB06-10, B45678, tet. En el caso de los anticuerpos denominados "D+" se observó un patrón de unión similar al de los anticuerpos de la región "D", salvo que no se observó ninguna unión con el hB06-10 en el caso de los anticuerpos D+. A pesar del
- 25 diferente patrón de unión a constructos lanzadera, los anticuerpos D+ compartían características funcionales (ensayos celulares, etc.) a los anticuerpos frente a la región D.

- 30 Ciertos anticuerpos de unión a D y D+ se unen en particular a la región definida en la SEQ ID NO:185, 186 o 187. Así, la invención se refiere en ciertas realizaciones a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a las secuencias de la región D de la SEQ ID NO:170, y dentro de esa región la SEQ ID NO:185, 186 o 187. Mediante la unión, estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, influyen en los niveles de PGRN y por tanto pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con PGRN, tal como DFT, ELA y EA.

Analizando más a fondo la unión de los anticuerpos D y D+ de la invención, se identificó la unión parcial a la región vecina (la región A) para algunos de los anticuerpos. Esta región corresponde a los aminoácidos 78-254 de **la SEQ ID NO:169**, como se muestra en **la SEQ ID NO:180** y a continuación:

SAPGEDEECG RVRDFVAKLA NNTHQHVFDL LRGSVSLSWV GDSTGVILVL
 TTFHVPLVIM TFGQSKLYRS EDYGKNFKDI TDLINNTFIR TFCGMAIGPE
 NSGKVVLTAE VSGGSRGGRI FRSSDFAKNF VQTDLPFHPL TQMMYSPQNS
 DYLLALSTEN GLWVSKNFGG KWEEIHK

5 A esta región se le ha dado el nombre de "región A".

Así, en ciertas realizaciones la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a la región D como se ha definido anteriormente y en las SEQ ID NO 170, 185, 186 o 187, y además tienen afinidad por la región A identificada en la SEQ ID NO 180. Dentro de la región A, determinados anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tienen afinidad por aminoácidos de la región A identificados en SEQ ID NO 181, 182, 183 ó 184.

La PGRN (proepitelina, precursor de la granulina-epitelina, factor de crecimiento derivado de células PC, acrogranina) codifica una glicoproteína secretada de 68.5 kDa que tiene 7.5 repeticiones de motivos de granulina más pequeños, que oscilan entre 6 y 25 kDa, que pueden escindir-se proteolíticamente del precursor PGRN (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81:600-6X2 (2003)). En las células no neuronales, la PGRN se ha asociado a diversos acontecimientos, tal como la regulación del ciclo celular y la motilidad celular (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 57:600-612 (2003); Monami, G., et al., Cancer Res. 5(5:7103-7110 (2006)), reparación de heridas, inflamación (Zhu, J., et al., Cell 777:867-878 (2002)), inducción de factores de crecimiento tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Tangkeangsitsin, W. & Serrero, G. Carcinogenesis 25:1587-1592 (2004)), y tumorigénesis (He, Z. & Bateman, A., J. Mol. Med. 81:600- 612 (2003), Monami, G., et al., Cancer Res 5(5:7103-7110 (2006); Serrero, G., Biochem Biophys. Res. Commun. 505:409-413 (2003), Lu, R & Serrero, G., Proc. Natl Acad Sa U.S.A 98 142-147 (2001); Liao, L M., et al., Cancer Res. 60:1353-1360 (2000)).

Las mutaciones de PGRN dan lugar a haploinsuficiencia (Baker, M., et al., Nature 442:916-919 (2006); Cruts, M., et al., Nature 442:920-924 (2006)) y se sabe que están presentes en casi el 50% de los casos de DFT familiar, lo que convierte a la mutación de PGRN en uno de los principales factores genéticos que contribuyen a la DFT (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C, Trends Genet. 24:186-194 (2008); Le Ber, I., et al., Brain 129:3051- 3065 (2006)). El carácter heterocigoto de pérdida de función de las mutaciones de PGRN implica que en individuos sanos, la expresión de PGRN desempeña un papel crítico, dependiente de la dosis en la protección de individuos sanos frente al desarrollo de DFT.

El término "anticuerpo" (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina o, según algunas realizaciones de la invención, a un fragmento de una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse a un epítopo de una molécula ("antígeno"). Los anticuerpos que se producen de forma natural comprenden normalmente un tetrámero que, habitualmente está compuesto por al menos dos cadenas pesadas (H, de "heavy") y al menos dos cadenas ligeras (L, de "light"). Cada cadena pesada está compuesta por un dominio variable de cadena pesada (abreviado en el presente documento como VH) y un dominio constante de cadena pesada, habitualmente compuesto por tres dominios (CH1, CH2 y CH3). Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (subtipos IgA1 e IgA2 subtipos), IgM e IgE. Cada cadena ligera está compuesta por un dominio variable de cadena ligera (abreviado en el presente documento como VL) y un dominio constante de cadena ligera (CL). Las cadenas ligeras incluyen cadenas kappa y cadenas lambda. El dominio variable de las cadenas pesada y ligera suele ser responsable del reconocimiento del antígeno, mientras que el dominio constante de las cadenas pesada y ligera puede mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad", que se intercalan con regiones de secuencia más conservada, denominadas "regiones marco" (FR). Cada VH y VL está compuesto por tres dominios de CDR y cuatro dominios de FR dispuestos desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Son especialmente importantes los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos que han sido "aislados" para que existan en un medio físico distinto de aquel en el que pueden encontrarse en la naturaleza o que han sido modificados para que difieran de un anticuerpo natural en la secuencia de aminoácidos.

El término "epítopo" designa un determinante antigénico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos suelen consistir en agrupamientos superficiales de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcar y suelen tener características estructurales tridimensionales, así como características específicas de carga. Los epítopos conformacionales y lineales se distinguen en que la unión al primero, pero no al segundo, siempre se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítopo puede comprender

residuos de aminoácido implicados directamente en la unión y otros residuos de aminoácido que no están implicados directamente en la unión, tales como residuos de aminoácido que se bloquean eficazmente por el péptido que se une al antígeno específicamente (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la huella del péptido que se une al antígeno específicamente).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo" significa un fragmento, porción, región o dominio de un anticuerpo (independientemente de cómo se produzca (*por ejemplo*, mediante escisión, recombinantemente, sintéticamente, *etc.*)) que es capaz de unirse a un epítipo, y por tanto el término "unión a antígeno" pretende significar lo mismo que "unión a epítipo" de modo que, por ejemplo, un "fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo" pretende ser lo mismo que un "fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo". Un fragmento de unión a antígeno puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o los 6 dominios CDR de dicho anticuerpo y, aunque puede unirse a dicho epítipo, puede presentar una especificidad, afinidad o selectividad para dicho epítipo que difiera de la de dicho anticuerpo. Preferiblemente, sin embargo, un fragmento de unión a antígeno contendrá los 6 dominios CDR de dicho anticuerpo. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede formar parte de, o comprender, una única cadena polipeptídica (por ejemplo, un scFv), o puede formar parte de, o comprender, dos o más cadenas polipeptídicas, cada una con un amino-terminal y un carboxilo terminal (por ejemplo, un diabody, un fragmento Fab, un fragmento Fab₂, *etc.*). Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos que presentan capacidad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante escisión por proteasa de anticuerpos intactos. Más preferiblemente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados de forma natural por genes separados, o los polinucleótidos que codifican dichas secuencias génicas (por ejemplo, su ADNc codificante) pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador flexible que permite fabricarlos como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se asocian para formar moléculas monovalentes de unión a antígeno (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 85:5879-5883). Alternativamente, empleando un enlazador flexible que sea demasiado corto (*por ejemplo* menos de unos 9 residuos) para permitir que los dominios VL y VH de una cadena polipeptídica única se asocien entre sí, se puede formar un anticuerpo biespecífico, diabody o molécula similar (en la que dos cadenas polipeptídicas de este tipo se asocian entre sí para formar una molécula bivalente de unión a antígeno) (véase, por ejemplo, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) para una descripción de diabodias). Ejemplos de fragmentos de unión a antígeno englobados dentro de la presente invención incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en WO2007059782; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en el dominio bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio VH y también llamado anticuerpos de dominio (Holt *et al.*; *Trends Biotechnol.* 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) camélidos o nanocuerpos (Revets *et al.*; *Expert Opin Biol Ther.* enero de 2005;5_(1): 11-24) y (vii) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un ligador sintético que permite que se produzcan como una sola cadena de proteína en la que los dominios VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla (scFv); véanse por ejemplo Bird *et al.*, *Science* 242, 423-426 (1988) y Huston *et al.*, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Estos y otros fragmentos de anticuerpo útiles en el contexto de la presente invención se comentan adicionalmente en el presente documento. También debería entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique otra cosa, también incluye polipéptidos de tipo anticuerpo, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de unirse al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede tener cualquier isotipo. Tal como se usa en el presente documento "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que está codificada por genes de dominio constante de cadena pesada. Dichos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica; la utilidad de los fragmentos adecuados capaces de unirse a un epítipo deseado puede explorarse fácilmente de la misma manera que un anticuerpo intacto.

El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que contiene dos fragmentos de unión a antígeno independientes que se dirigen cada uno a dianas independientes. Estas dianas pueden ser epítopos presentes en diferentes proteínas o diferentes epítopos presentes en la misma diana. Pueden obtenerse moléculas de anticuerpo biespecífico usando cambios de aminoácidos compensatorios en los dominios constantes de las HC de las moléculas de anticuerpo bivalente monoespecífico parentales. El anticuerpo heterodimérico resultante contiene un Fab aportado a partir de dos anticuerpos monoespecíficos parentales diferentes. Los cambios de aminoácidos en el dominio Fc conducen a una mayor estabilidad del anticuerpo heterodimérico con biespecificidad que es estable a lo largo del tiempo. (Ridgway *et al.*, *Protein Engineering* 9, 617-621 (1996), Gunasekaran *et al.*, *JBC* 285, 19637-1(2010), Moore *et al.*, *MAbs* 3:6 546-557 (2011), Strop *et al.*, *JMB* 420, 204-219 (2012), Metz *et al.*, *Protein Engineering* 25:10 571-580 (2012), Labrijn *et al.*, *PNAS* 110:113, 5145 -5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein *et al.*, *MAbs* 5:5 646-654 (2013)). Los anticuerpos biespecíficos también pueden incluir moléculas que se generan usando fusiones de ScFv. Dos scfv monoespecíficos entonces se unen independientemente a dominios Fc que

pueden formar heterodímeros estables para generar una sola molécula biespecífica (Mabry *et al.*, PEDS 23: 3 115-127 (2010)). Las moléculas biespecíficas tienen capacidades de unión dobles.

Un "anticuerpo anti-Sortilina" o "anticuerpo Sortilina" (utilizados indistintamente en el presente documento, dependiendo del contexto en el que se escriba) es un anticuerpo un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Sortilina, y especialmente a la Región D de Sortilina, **la SEQ ID NO:170**. Un anticuerpo anti-sortilina que se une a la región D de sortilina se unirá habitualmente a un epítipo conformacional o un epítipo lineal de 3, 4, 5, 6 ó 7 aminoácidos consecutivos dentro de la región D (por ejemplo **SEQ ID NO:185, 186 ó 187**) con una afinidad (CI50) en o por debajo de 22 nM, tal como de entre 22 nM y 1 nM, entre 10 nM y 1 nM o entre 5 nM y 1 nM. Según algunas realizaciones, los anticuerpos antisortilina también pueden unirse a la región A (**la SEQ ID NOs:180, 181, 182, 183 o 184**) aunque se hace hincapié en que se cree que su función biológica principal se consigue mediante la unión a la región D.

El sitio de unión identificado es bastante único, como demuestra, por ejemplo, la unión del ligando selectivo de molécula pequeña AF38469 a la Sortilina. Se ha demostrado que el sitio de unión del AF38469 es similar al sitio de unión de la neurotensina y se ha caracterizado mediante cristalografía de rayos X (Schröder *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 1 de enero de 2014;24(1):177-80). Se ha informado que PGRN se une al mismo sitio (Lee *et al.* Hum Mol Genet. 2013). Los anticuerpos 45 y 68, que se unen a la región D, y D+ respectivamente, no inhibieron la unión de AF38469 a sortilina. Estos datos sugieren que estos anticuerpos tienen un sitio de unión para sortilina distinto del sitio de unión para AF38469 y neurotensina. Por tanto, en determinadas realizaciones la invención se refiere a un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que puede unirse específicamente a sortilina e inhibir la unión de PGRN a sortilina, pero que la unión no inhibe o no inhibe sustancialmente la unión de neurotensina o AF38469 a sortilina. Esto puede mostrarse usando por ejemplo el desplazamiento de unión a sortilina usando un ensayo de proximidad de centelleo (SPA) (ejemplo 11). Una manera de explicar este hallazgo podría ser que los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a áreas de superficie de sortilina mientras que las moléculas pequeñas como neurotensina se unen en el interior de una cavidad de unión.

El término "anticuerpo humano" (que puede abreviarse como "humAb" o "HuMab"), tal y como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos con dominios variables y constantes derivados de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis al azar o dirigida *in vitro* o durante reordenamiento génico o por mutación somática *in vivo*).

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal convencional presenta una sola especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal puede estar compuesto por más de un dominio Fab aumentando de esta manera la especificidad por más de una diana. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" no pretenden estar limitados por ningún método particular de producción (*por ejemplo*, recombinante, transgénico, hibridoma, etc.).

Los anticuerpos de la presente invención, y sus fragmentos de unión al antígeno sortilina serán preferiblemente humanos o, por ejemplo para los anticuerpos de ratón (denotados 1F2, 5E1), "humanizados", particularmente si se emplean con fines terapéuticos. El término "humanizado" se refiere a una molécula, generalmente preparada mediante técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina restante basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender o bien dominios variables de anticuerpo no humano completos fusionados a dominios humanos constantes, o bien solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de dichos dominios variables injertados en regiones de entramado conservadas humanas apropiadas de dominios variables humanos. Los residuos de la estructura de tales moléculas humanizadas pueden ser de tipo salvaje (*por ejemplo*, totalmente humanos) o pueden modificarse para contener una o más sustituciones de aminoácidos que no se encuentran en el anticuerpo humano cuya secuencia ha servido de base para la humanización. La humanización disminuye o elimina la probabilidad de que un dominio constante de la molécula actúe como inmunógeno en individuos humanos, pero sigue existiendo la posibilidad de una respuesta inmunitaria al dominio variable extraño (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 86:4220-4224). Otro enfoque se centra no solo en proporcionar dominios constantes derivados de ser humano, sino en modificar también los dominios variables para reformarlos de forma que se parezcan lo máximo posible a la forma humana. Se sabe que los dominios variables tanto de las cadenas pesadas como de las cadenas ligeras contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones de entramado (FR) que están relativamente conservadas en una especie dada y que supuestamente proporcionan un armazón para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno concreto, los dominios variables pueden "remodelarse" o "humanizarse" injertando CDR derivados del anticuerpo no humano en los FR presentes en el anticuerpo humano que se va a modificar. La aplicación de este enfoque a varios anticuerpos ha sido descrita por Sato, K. *et al.* (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332:323-327;

Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 89:4285-4289; y Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR «derivadas de» una o más CDR del anticuerpo original. La capacidad de humanizar un antígeno es bien conocida (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses No. 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.859.205; 6.407.213; 6.881.557).

El término "anticuerpo "XX" pretende denotar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo anticuerpo "5E1"), que comprende o consiste en la Cadena Ligera, el Dominio Variable de Cadena Ligera, o el Dominio Variable de Cadena Ligera CDR1-3, como se define por su respectivo la SEQ ID NO, y la Cadena Pesada, Dominio Variable de Cadena Pesada, o Dominio Variable de Cadena Pesada CDR1-3 como se define por su respectivo la SEQ ID NO. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se define mediante su dominio variable de cadena pesada completo que comprende tal como se define mediante su SEQ ID NO y su dominio variable de cadena ligera tal como se define mediante su SEQ ID NO.

La numeración de los residuos de aminoácidos en esta región es conforme a IMGT®, el sistema internacional de información ImMunoGeneTics® o, Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). la SEquences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, NIH Publication No. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Estructuras canónicas para los dominios hipervariables de las inmunoglobulinas. J. Mol. Biol. 196, 901-917

Tal como se utiliza en el presente documento, se dice que un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une "específicamente" a una región de otra molécula (es decir, un epítipo) si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad o aidez con ese epítipo en relación con epítopos alternativos. En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención se une a su diana (sortilina) con una fuerza al menos 10 veces mayor que a otra molécula; preferiblemente, con una fuerza al menos 50 veces mayor y más preferiblemente con una fuerza al menos 100 veces mayor. Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une en condiciones fisiológicas, por ejemplo, *in vivo*. Así, por "unión específica a Sortilina", incluimos la capacidad del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de unirse a Sortilina con dicha especificidad y/o en dichas condiciones. Los métodos adecuados para determinar dicha unión los conocerán los expertos en la técnica, y se describen métodos ejemplares en los ejemplos adjuntos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término «unión» en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado se refiere típicamente a la unión con una afinidad correspondiente a una KD de alrededor de 10^{-7} M o menos, tal como alrededor de 10^{-8} M o menos, tal como alrededor de 10^{-9} M o menos cuando se determina mediante, por ejemplo, la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore® 3000 o T200 utilizando el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al menos diez veces menor, por ejemplo, al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1,000 veces menor, por ejemplo, al menos 10,000 veces menor, por ejemplo, al menos 100,000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o de un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la KD del anticuerpo, de modo que cuando la KD del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), entonces la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10,000 veces. En particular, la invención se refiere a anticuerpos anti-sortilina que muestran una afinidad de unión correspondiente a o por debajo de 22 nM, tal como de entre 22 nM y 1 nM, entre 10 nM y 1 nM o entre 5 nM y 1 nM, cuando se determina mediante, por ejemplo, interferometría de biocapa usando un instrumento Octet 384RED (ejemplo 8).

En ciertas realizaciones de la invención, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo capaz de competir con el anticuerpo humAb 45 o el anticuerpo humAb 68 para unirse a Sortilina. En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de competir con el anticuerpo 45 para unirse a la región D de Sortilina como se define en la SEQ ID NO:170. Dicha inhibición de unión competitiva puede determinarse mediante ensayos y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo utilizando chips BIAcore® con Sortilina humana inmovilizada e incubando con un anticuerpo de referencia (tal como el anticuerpo "45" o "68") con y sin un polipéptido de anticuerpo a ensayar. Alternativamente, puede utilizarse un enfoque de mapeo por pares, en el que un anticuerpo de referencia (tal como el anticuerpo "45" o "68") se inmoviliza en la superficie del chip BIAcore®, el antígeno Sortilina humana se une al anticuerpo

inmovilizado, y, a continuación, se comprueba la capacidad de unión simultánea de un segundo anticuerpo a la Sortilina humana (véase 'BIAcore® Assay Handbook', GE Healthcare Life Sciences, 29-0194-00 AA 05/2012).

El término "kd" (seg⁻¹ o 1/s), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se denomina valor de koff.

- 5 El término "ka" (M⁻¹ x s⁻¹ o 1/Mseg), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término "KD" (M), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la kd por la ka.

- 10 El término "KA" (M⁻¹ o 1/M), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de asociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la ka por la kd.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que presenta una o más de las siguientes propiedades:

- (i) una afinidad de unión (K_D) para Sortilina de entre 0.5-10 nM, tal como 1-5 nM o 1-2 nM;
- (ii) capacidad de reducir y/o inhibir la unión de PGRN a Sortilina;
- 15 (iii) capacidad de reducir y/o inhibir el aclaramiento de PGRN por las células que expresan Sortilina;
- (iv) capacidad de reducir y/o inhibir la endocitosis de PGRN por células que expresan Sortilina;
- (v) capacidad de aumentar la cantidad y/o concentración de PGRN en el plasma en ratones knock-in que expresan Sortilina humana.

- 20 El término "capacidad de reducir y/o inhibir la unión de PGRN a Sortilina" incluye un anticuerpo que tiene la capacidad de inhibir la unión a PGRN a una IC₅₀ inferior a 50nM pero preferiblemente entre 10nM y 0.2 nM usando un ensayo de fluorescencia resuelto en el tiempo (HTFR) divulgado en el **Ejemplo 10**.

- 25 El término "capacidad de reducir y/o inhibir el aclaramiento de PGRN por células que expresan Sortilina" incluye la capacidad de aumentar la concentración de PGRN en el medio en al menos un 25 %, tal como entre un 25 % y un 500 %, entre un 25 % y un 400 % o entre un 25 % y un 200 % según se mide mediante un ensayo ELISA como se divulga en el **Ejemplo 13**.

La "capacidad de reducir y/o inhibir la endocitosis de PGRN por células que expresan Sortilina" incluye la capacidad de reducir la concentración intracelular de PGRN en al menos un 10 %, pero preferiblemente entre un 20 % y un 100 %, medido mediante un ensayo basado en celómica como se divulga en el **Ejemplo 12**.

- 30 La "capacidad de aumentar la cantidad y/o concentración de PGRN en el plasma en ratones knock-in que expresan Sortilina humana" incluye la capacidad de aumentar la concentración de PGRN en el plasma en al menos un 25 % pero preferiblemente entre un 50 y un 500 por ciento según se mide mediante un ensayo ELISA como se divulga en el **Ejemplo 15**.

- 35 Se prevé que la capacidad de aumentar la PGRN en el cerebro también pueda evaluarse, por ejemplo, mediante microdiálisis. Así, por "capacidad de aumentar la cantidad y/o concentración de PGRN en el cerebro" se incluye la capacidad de aumentar la concentración de PGRN en el cerebro en al menos un 25 %, pero preferiblemente entre un 50 y un 500 por ciento, medido por microdiálisis.

- 40 En algunos anticuerpos, sólo parte de un CDR, concretamente el subconjunto de residuos CDR necesarios para la unión, denominados SDRs, son necesarios para mantener la unión en un anticuerpo humanizado. Los residuos de CDR que no están en contacto con el epítopo relevante y que no se encuentran en las SDRs pueden identificarse basándose en estudios anteriores (por ejemplo, los residuos H60-H65 en la CDR H2 no suelen ser necesarios), a partir de regiones de CDR de Kabat situadas fuera de los bucles hipervariables de Chothia (véase, Kabat et al. (1992) *SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST*, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917), mediante modelización molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales, N.R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity", Mol. Immunol. 41:863-872. En dichos anticuerpos humanizados en las posiciones en las que están ausentes uno o más residuos de CDR donantes o en las que se omite una CDR donante completa, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (mediante numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de dichas sustituciones de aminoácidos aceptores por donantes en las CDR a incluir refleja un equilibrio de consideraciones competitivas. Dichas sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y disminuir en consecuencia la inmunogenicidad potencial. Sin embargo, las sustituciones también pueden provocar cambios de la afinidad y, preferiblemente, se evitan reducciones

significativas de la afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDR y los aminoácidos que van a sustituirse también pueden seleccionarse de forma empírica.

El hecho de que una única alteración aminoacídica de un residuo CDR pueda provocar la pérdida de la unión funcional (Rudikoff, S. etc. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-binding Specificity", Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 79(6):1979-1983) proporciona un medio para identificar sistemáticamente secuencias CDR funcionales alternativas. En un método preferido para obtener dichas CDRs variantes, se mutageniza un polinucleótido que codifica la CDR (por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o por un método dirigido al sitio (por ejemplo, amplificación mediada por cadena de polimerasa con cebadores que codifican el locus mutado)) para producir una CDR que tenga un residuo de aminoácido sustituido. Comparando la identidad del residuo importante en la secuencia original (funcional) de CDR con la identidad de la secuencia variante sustituida (no funcional) de CDR, puede identificarse la puntuación de sustitución BLOSUM62.iiij para esa sustitución. El sistema BLOSUM proporciona una matriz de sustituciones de aminoácidos creada mediante el análisis de una base de datos de secuencias para alineaciones de confianza (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," Nature Biotech. 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 89:10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular la SEquence Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565 Actualmente, la base de datos BLOSUM más avanzada es la base de datos BLOSUM62 (BLOSUM62.iiij). La **tabla 1** presenta las puntuaciones de sustitución de BLOSUM62.iiij (a mayor puntuación, mas conservativa es la sustitución y, por tanto, más probable es que la sustitución no afecte a la función). Si un fragmento de unión a antígeno que comprende la CDR resultante no se une a sortilina, por ejemplo, entonces la puntuación de sustitución BLOSUM62.iiij se considera como insuficientemente conservativa y se selecciona y se produce una nueva sustitución candidata que tenga una mayor puntuación de sustitución. Así, por ejemplo, si el residuo original era glutamato (E), y el residuo sustituto no funcional era histidina (H), entonces la puntuación de sustitución BLOSUM62.iiij será 0, y se prefieren cambios más conservativos (tales como a aspartato, asparagina, glutamina o lisina).

Tabla 1																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

Por tanto, la invención contempla el uso de mutagénesis aleatoria para identificar CDRs mejoradas. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservativas pueden definirse mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las tres tablas siguientes:

Clases de residuos de aminoácidos para sustituciones conservativas:

Tabla 2	
Residuos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Residuos básicos	Lys (K), Arg (R) y His (H)

Tabla 2	
Residuos hidrófilos no cargados	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Residuos alifáticos no cargados	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Residuos apolares no cargados	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Residuos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

Clases alternativas de sustituciones conservativas de los residuos de aminoácidos:

Tabla 3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de los residuos de aminoácidos

Tabla 4	
Residuos que contienen grupos alcohol	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V y M
Residuos asociados a cicloalqueno	F, H, W and Y
Residuos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W and Y
Residuos cargados negativamente	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Residuos cargados positivamente	H, K y R
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Residuos muy pequeños	A, G y S
Residuos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

Las agrupaciones de sustituciones más conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

- 5 También pueden formularse grupos adicionales de aminoácidos utilizando los principios descritos, por ejemplo, en Creighton (1984) *Proteins: Estructura y propiedades moleculares* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

La tecnología de visualización de fagos puede utilizarse como alternativa para aumentar (o disminuir) la afinidad de las CDR. Esta tecnología, denominada maduración por afinidad, emplea la mutagénesis o «recorrido de CDR» y la re-selección utiliza el antígeno diana o un fragmento antigénico de unión a antígeno del mismo para identificar anticuerpos que tienen CDR que se unen con mayor (o menor) afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (Véase, por ejemplo, Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149:3903). La mutagénesis de codones completos en lugar de nucleótidos individuales da como resultado un repertorio de mutaciones de aminoácidos semialeatorizadas. Pueden construirse bibliotecas que consisten en un grupo de clones variantes cada uno de los cuales difiere en una única alteración de aminoácido en una única CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácido para cada residuo de CDR. Los mutantes con afinidad de unión aumentada (o disminuida) por el antígeno pueden explorarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con el antígeno marcado. Puede utilizarse cualquier método de cribado conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con mayor o menor afinidad por el antígeno (por ejemplo, ELISA) (véase Wu et al. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994). Se puede utilizar el CDR walking que aleatoriza la cadena ligera (véase, Schier et al., 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551).

Los métodos para llevar a cabo dicha maduración de la afinidad se describen, por ejemplo, en: Krause, J.C. et al. (2011) «An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody,» *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-

Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas," *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes," *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," *Virology* 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development", *Methods Mol. Biol.* 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," *Mol. Immunol.* 46(1):135-144; y Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling", *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 105(26):9029-9034.

Así, la secuencia de las variantes de CDR de los anticuerpos abarcados o de sus fragmentos de unión a antígeno puede diferir de la secuencia de la CDR del anticuerpo original mediante sustituciones; por ejemplo, sustitución de 4 residuos de aminoácidos, 3 residuos de aminoácidos, 2 residuos de aminoácidos o 1 de los residuos de aminoácidos. Según una realización de la invención, se prevé además que los aminoácidos en las regiones CDR puedan sustituirse con sustituciones conservativas, tal como se define en las siguientes 3 tablas.

El término "animal no humano transgénico" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas humanos de cadena pesada y/o ligera (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos totalmente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén humano de cadena ligera y, o bien un transgén humano de cadena pesada, o bien un transcromosoma humano de cadena pesada, de modo que el ratón produce anticuerpo antisortilina humana cuando se inmuniza con antígeno de sortilina y/o células que expresan sortilina. El transgén humano de cadena pesada puede estar integrado en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, ratones AcMhu tales como ratones HCo7 o HCo12, o el transgén humano de cadena pesada puede mantenerse extracromosómicamente, como en el caso de los ratones transcromosómicos KM, como se describe en el documento WO02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (denominados de forma colectiva en el presente documento como "ratones transgénicos") pueden producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos frente a un antígeno dado (tales como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) experimentando una recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

Los animales no humanos transgénicos también pueden utilizarse para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico mediante la introducción de genes que codifiquen dicho anticuerpo específico, por ejemplo, vinculando operativamente los genes a un gen que se exprese en la leche del animal.

El término «tratamiento» o «tratar», tal como se utiliza en el presente documento, significa mejorar, ralentizar, atenuar o invertir el progreso o la gravedad de una enfermedad o trastorno, o mejorar, ralentizar, atenuar o invertir uno o más síntomas o efectos secundarios de dicha enfermedad o trastorno. A efectos de la presente invención, «tratamiento» o «tratar» significa además un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados, donde «resultados clínicos beneficiosos o deseados» incluyen, sin limitación, el alivio de un síntoma, la disminución de la extensión de un trastorno o enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de enfermedad o trastorno, retraso o ralentización de la progresión de un estado de enfermedad o trastorno, mejora o paliación de un estado de enfermedad o trastorno, y remisión de una enfermedad o trastorno, ya sea parcial o total, detectable o indetectable.

Una «cantidad eficaz», cuando se aplica a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, se refiere a una cantidad suficiente, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un efecto biológico previsto o un resultado terapéutico deseado, incluidos, sin limitación, los resultados clínicos. La frase «cantidad terapéuticamente eficaz», cuando se aplica a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, pretende denotar una cantidad del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que es suficiente para mejorar, paliar, estabilizar, revertir, ralentizar, atenuar o retrasar la progresión de un trastorno o estado de enfermedad, o de un síntoma del trastorno o enfermedad. En una realización, el método de la presente invención proporciona la administración del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinaciones con otros compuestos. En dichos casos, la "cantidad eficaz" es la cantidad de la combinación suficiente para causar el efecto biológico deseado.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antisortilina o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede variar en función de factores tal como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo antisortilina o fragmento de unión a antígeno del mismo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción del anticuerpo.

Los anticuerpos son preferiblemente humanos o humanizados.

La numeración de los residuos de aminoácidos en esta región es conforme a IMGT®, el sistema internacional de información ImMunoGeneTics® o, Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C. (1991). la SEQuences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, NIH Publication No. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Estructuras canónicas para los dominios hipervariables de las inmunoglobulinas. J. Mol. Biol. 196, 901-917

Anticuerpo 5E1:

Por consiguiente, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:1**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:2**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:3**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:4**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:5**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:6**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:8** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:7**.

Anticuerpo 1F2:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:9**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:10**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:11**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:12**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:13**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:14**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:16** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:15**.

Anticuerpo 068:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:17**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:18**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:19**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:20**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:21**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:22**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:24** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:23**.

Anticuerpo 1320:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:25**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:26**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:27**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:28**;
- 5 (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:29**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:30**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:32** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:31**.

Anticuerpo 93-05:

10 Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:33**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:34**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:35**;
- 15 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:36**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:37**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:38**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:40** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:39**.

20 **Anticuerpo 93-01:**

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:41**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:42**;
- 25 (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:43**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:44**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:45**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:46**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:48** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:47**.

30

Anticuerpo 924:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:49**;
- 35 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:50**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:51**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:52**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:53**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:54**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:56** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:55**.

Anticuerpo 1276:

5 Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:57**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:58**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:59**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:60**;
- 10 (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:61**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:62**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:64** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:63**.

Anticuerpo 849:

15 Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:65**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:66**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:67**;
- 20 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:68**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:69**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:70**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:72** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:71**.

25 **Anticuerpo 531-02:**

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:73**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:74**;
- 30 (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:75**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:76**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:77**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:78**.

35 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:80** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:79**.

Anticuerpo 548-01:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:81**;
- 40 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:82**;

- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:83**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:84**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:85**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:86**.

5 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:88** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:87**.

Anticuerpo 548-02:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- 10 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:89**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:90**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:91**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:92**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:93**; y
- 15 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:94**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:96** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:95**.

Anticuerpo 1289-02:

20 Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:97**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:98**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:99**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:100**;
- 25 (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:101**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:102**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:104** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:103**.

Anticuerpo 811-02:

30 Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:105**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:106**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:107**;
- 35 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:108**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:109**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:110**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:112** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:111**.

40 **Anticuerpo 566-01:**

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:113**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:114**;
- 5 (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:115**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:116**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:117**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:118**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:120** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:119**.

Anticuerpo 562:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:121**;
- 15 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:122**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:123**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:124**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:125**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:126**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:128** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:127**.

Anticuerpo 193:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- 25 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:129**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:130**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:131**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:132**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:133**; y
- 30 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:134**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:136** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:135**.

Anticuerpo 88:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:137**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:138**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:139**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:140**;
- 40 (e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:141**; y

(f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:142**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:144** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:143**.

Anticuerpo 045:

5 Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

(a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:145**;

(b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:146**;

(c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:147**;

10 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:148**;

(e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:149**; y

(f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:150**.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:152** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:151**.

15 **Anticuerpo 044:**

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

(a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:153**;

(b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:154**;

20 (c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:155**;

(d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:156**;

(e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:157**; y

(f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:158**.

25 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:160** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:159**.

Anticuerpo 002:

Según otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende o consiste en:

(a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:161**;

30 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:162**;

(c) una CDR3 de cadena ligera que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:163**;

(d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:164**;

(e) una CDR2 de cadena pesada que tenga la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:165**; y

(f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **la SEQ ID NO:166**.

35 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal puede comprender o consistir en el dominio variable de cadena pesada de **la SEQ ID NO:168** y el dominio variable de cadena ligera de **la SEQ ID NO:167**.

Los anticuerpos mencionados anteriormente pueden, según una realización, comprender además una variante con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos de dichas secuencias CDR1, CDR2, y/o CDR3 (VH y/o VL).

40

Además, los anticuerpos pueden estar en una composición junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en terapia. En particular, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en el tratamiento de DFT o ELA o proteinopatías TDP43 tal como la Enfermedad de Alzheimer (EA).

El tratamiento previsto por la presente invención puede ser crónico y el paciente puede ser tratado al menos 2 semanas, tal como al menos durante 1 mes, 6, meses, 1 año o más.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales producidos por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o pueden ser anticuerpos monoclonales producidos por ADN recombinante u otros métodos. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos fago utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales a partir de cualquier fuente adecuada. De esta manera, por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas preparados a partir de linfocitos B esplénicos murinos obtenidos a partir de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpo de seres humanos inmunizados o de mamíferos no humanos tales como ratas, conejos, perros, ovejas, cabras, primates, etc.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra sortilina usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones AcMhu y ratones KM, respectivamente.

El ratón HuMAb contiene un miniloco genético de inmunoglobulina humana que codifica secuencias humanas no reordenadas de inmunoglobulina de cadena pesada variable y constante (μ e Y) y de cadena ligera variable y constante (κ), junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y K (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o K de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadenas pesadas y ligeras introducidos, sufren cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales humanos IgG, κ de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones AcMhu se describe con detalle en Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una alteración JKD en sus genes de cadena ligera endógena (κ) (como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993)), una alteración CMD en sus genes de cadena pesada endógena (como se describe en el **Ejemplo 1** del documento WO 01/14424), y un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). Adicionalmente, los ratones HCo7 tienen un transgén HCo7 de cadena pesada humana (tal como se describe en el documento US 5.770.429), los ratones HCo12 tienen un transgén HCo12 de cadena pesada humana (tal como se describe en el **ejemplo 2** del documento WO 01/14424), los ratones HCo17 tienen un transgén HCo17 de cadena pesada humana (tal como se describe en el **ejemplo 2** del documento WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen un transgén HCo20 de cadena pesada humana. Los ratones resultantes expresan transgenes de cadena ligera kappa y pesada de inmunoglobulina humana en un escenario homocigoto para la rotura de los loci endógenos de cadena ligera kappa y pesada de ratón.

En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en el **Ejemplo 1** del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, tal como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento hCF del cromosoma 14 (SC20), tal como se describe en el documento WO 02/43478. Pueden generarse ratones HCo12-Balb/c, HCo17-Balb/c y HCo20-Balb/c por cruce de HCo12, HCo17 y HCo20 con KCo5[J/K](Balb) tal como se describe en el documento WO 09/097006.

En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en el **Ejemplo 1** del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, tal como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada

humana compuesto por el fragmento de unión a antígeno del cromosoma 14 hCF (SC20) tal como se describe en el documento WO 02/43478.

Los esplenocitos de estos ratones transgénicos pueden utilizarse para generar hibridomas que segreguen anticuerpos monoclonales humanos según técnicas bien conocidas. También pueden generarse anticuerpos monoclonales o policlonales humanos de la presente invención, o anticuerpos de la presente invención que proceden de otras especies, transgénicamente mediante la generación de otro mamífero no humano o planta que es transgénica para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir de dichos organismos. En relación con la producción transgénica en mamífero, pueden producirse anticuerpos en, y recuperarse a partir de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5,827,690; US 5,756,687; US 5,750,172 y US 5,741,957.

El anticuerpo de la invención puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo normalmente estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como la inducción de ADCC. Son isotipos ejemplares IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Puede usarse cualquiera de los dominios constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo anti-sortilina de la presente invención puede cambiarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que originariamente era IgM puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG de la presente invención. Además, pueden utilizarse técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo de IgG1 a IgG2. Por tanto, la función efectora de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención puede cambiarse mediante cambio de isotipo, por ejemplo, a un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM para diversos usos terapéuticos. En una realización un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG1, por ejemplo una IgG1, κ . Se dice que un anticuerpo es de un isotipo particular si su secuencia de aminoácidos es más homóloga a ese isotipo que a otros isotipos.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente un anticuerpo IgG, en particular un anticuerpo IgG1, κ . En otra realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento de unión a antígeno o un anticuerpo de cadena sencilla.

Los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos pueden obtenerse, por ejemplo, por fragmentación de la unión a antígenos mediante técnicas convencionales, y la utilidad de los fragmentos de unión a antígenos puede analizarse de la misma manera que se describe en el presente documento para los anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos de unión a antígeno F(ab')₂ mediante tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento de unión a antígeno F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos de unión a antígeno Fab'. Pueden obtenerse fragmentos de unión a antígeno Fab mediante tratamiento de un anticuerpo IgG con papaína; pueden obtenerse fragmentos de unión a antígeno Fab' mediante digestión con pepsina de un anticuerpo IgG. También puede producirse un fragmento F(ab') de unión a antígeno uniendo Fab'- descrito más adelante por medio de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento de unión a antígeno Fab' es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo obtenido por corte de un enlace disulfuro del dominio de bisagra del F(ab')₂. Puede obtenerse un fragmento Fab' de unión a antígeno tratando un fragmento F(ab')₂ de unión a antígeno con un agente reductor, tal como ditiotreitól. También puede generarse un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo mediante expresión de ácidos nucleicos que codifican para dichos fragmentos de unión a antígeno en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans *et al.*, J. Immunol. Met. 184, 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica para una parte de un fragmento de unión a antígeno F(ab')₂ podría incluir secuencias de ADN que codifican para la región CH1 y el dominio de bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de la traducción para producir dicha molécula de fragmento de unión a antígeno de anticuerpo truncada.

En una realización, el anticuerpo anti-Sortilina es un anticuerpo monovalente, preferiblemente un anticuerpo monovalente como se describe en WO2007059782 que tiene una delección de la región bisagra. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente, donde dicho anticuerpo anti-sortilina se construye mediante un método que comprende: i) proporcionar un constructo de ácido nucleico que codifica para la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicho constructo una secuencia de nucleótidos que codifica para la región VL de un anticuerpo anti-sortilina específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica para la región CL constante de una Ig, donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica para la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica para la región CL de una Ig están unidas operativamente entre sí, y donde, en el caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica para la región CL se ha modificado de tal forma que la región CL no contiene ningún aminoácido que pueda formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CL en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal o ser humano; ii) proporcionar un constructo de ácido nucleico que codifica para la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicho constructo una secuencia de nucleótidos que codifica para la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica para una región CH constante de una Ig humana, donde la secuencia de nucleótidos que codifica para la región CH se ha modificado de tal forma que la región que corresponde a la región bisagra y, cuando se requiere por el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, tales como la región CH3, no comprende ningún resto de aminoácido que participa en la formación de enlaces disulfuro o enlaces covalentes

estables entre las cadenas pesadas con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un ser humano, donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica para la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica para la región CH de dicha Ig están unidas operativamente entre sí; iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente; iv) producir dicho anticuerpo monovalente mediante coexpresión de los constructos de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

Del mismo modo, en una realización, el anticuerpo anti-Sortilina es un anticuerpo monovalente, que comprende:

(i) un dominio variable de un anticuerpo de la invención tal como se describe en el presente documento o una parte de unión a antígeno de dicho dominio, y

(ii) un dominio CH de una inmunoglobulina o un dominio de la misma que comprenda los dominios CH2 y CH3, en el que el dominio CH o el dominio de la misma haya sido modificado de tal manera que el dominio correspondiente al dominio bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otros dominios del dominio CH como el dominio CH3, no comprendan ningún residuo de aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro con un dominio CH idéntico u otros enlaces covalentes o no covalentes estables entre cadenas pesadas con un dominio CH idéntico en presencia de IgG humana policlonal.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo monovalente se ha modificado de forma que se ha eliminado toda la región bisagra.

En otra realización, la secuencia del anticuerpo monovalente se ha modificado para que no comprenda ningún sitio aceptor para la glicosilación ligada a N.

La invención también incluye "Anticuerpos biespecíficos", en los que una región de unión anti-Sortilina (por ejemplo, una región de unión a Sortilina de un anticuerpo monoclonal anti-Sortilina) forma parte de un andamiaje bivalente o polivalente biespecífico que se dirige a más de un epítipo, (por ejemplo, un segundo epítipo podría comprender un epítipo de un receptor de transporte activo, de forma que el Anticuerpo Biespecífico presentaría una transcitosis mejorada a través de una barrera biológica, tal como la Barrera hematoencefálica). De esta manera, en otra realización adicional, el Fab monovalente de un anticuerpo anti-sortilina puede unirse a un Fab o scFv adicional que se dirige a una proteína diferente para generar un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico puede tener una función doble, por ejemplo, una función terapéutica impartida por un dominio de unión anti-sortilina y una función de transporte que puede realizar la unión a una molécula receptora para mejorar la transferencia a través de una barrera biológica, tal como la barrera hematoencefálica.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención también incluyen anticuerpos de cadena simple. Los anticuerpos de cadena sencilla son péptidos en los que las regiones Fv de cadena pesada y ligera están conectadas. En una realización, la presente invención proporciona un Fv de cadena sencilla (scFv) en el que las cadenas pesada y ligera del Fv de un anticuerpo anti-sortilina de la presente invención están unidas con un ligador peptídico flexible (normalmente de alrededor de 10, 12, 15 o más residuos de aminoácidos) en una sola cadena de péptido. Se describen métodos para producir dichos anticuerpos, por ejemplo, en el documento US 4,946,778, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994), Bird *et al.*, *Science* 242, 423-426 (1988), Huston *et al.*, *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988) y McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554 (1990). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si sólo se usa una sola VH y VL, bivalente, si se usan dos VH y VL, o polivalente, si se usan más de dos VH y VL.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento pueden modificarse mediante la inclusión de cualquier número adecuado de aminoácidos modificados y/o asociaciones con dichos sustituyentes conjugados. La idoneidad en este contexto está determinada generalmente por la capacidad de conservar, al menos sustancialmente, selectividad por sortilina y/o la especificidad anti-sortilina asociada con el anticuerpo anti-sortilina parental no derivatizado. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa, por ejemplo, al aumentar la semivida en suero del polipéptido, reducir la antigenicidad del polipéptido o aumentar la estabilidad del polipéptido durante el almacenamiento. Los aminoácidos se modifican, por ejemplo, de forma cotraduccional o postraduccional durante la producción recombinante (por ejemplo, N-glicosilación en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifica mediante medios sintéticos. Los ejemplos no limitativos de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranil-geranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado y similares. La bibliografía está repleta de referencias adecuadas para guiar al experto en la modificación de aminoácidos. Se encuentran protocolos de ejemplos en Walker (1998) *Protein Protocols On CD-Rom*, Humana Press, Totowa, NJ. El aminoácido modificado puede seleccionarse, por ejemplo, a partir de un aminoácido glicosilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido conjugado con un resto de lípido, o un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.

Los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos de la invención también pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida circulante. Polímeros de ejemplo y métodos para unirlos a péptidos se ilustran, por ejemplo, en los documentos US 4.766.106; US 4.179.337; US 4.495.285 y US 4.609.546. Polímeros ilustrativos adicionales incluyen, por ejemplo, polioles polioxiethylados y polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1,000 y aproximadamente 40,000, tal como entre aproximadamente 2,000 y aproximadamente 20,000, por ejemplo, aproximadamente 3,000-12,000 g/mol).

Los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos de la presente invención pueden utilizarse además en un método de diagnóstico o como ligando de diagnóstico por imagen.

En una realización, se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Puede usarse un anticuerpo anti-sortilina radiomarcado tanto para fines de diagnóstico como para fines terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Ejemplos no limitativos de tales etiquetas incluyen, pero no se limitan a bismuto (^{213}Bi), carbono (^{11}C , ^{13}C , ^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co , ^{60}Co), cobre (^{64}Cu), disprosio (^{165}Dy), erbio (^{169}Er), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), oro (^{198}Au), holmio (^{166}Ho), hidrógeno (^3H), indio (^{111}In , ^{112}In , ^{113}In , ^{115}In), yodo (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), iridio (^{192}Ir), hierro (^{59}Fe), criptón ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), lantano (^{140}La), lutelio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), nitrógeno (^{13}N , ^{15}N), oxígeno (^{15}O), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), potasio (^{42}K), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rubidio (^{81}Rb , ^{82}Rb), rutenio (^{82}Ru , ^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{76}Se), sodio (^{24}Na), estroncio (^{85}Sr , ^{89}Sr , ^{92}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Yb), itrio (^{90}Y) y zinc (^{65}Zn). En la técnica se conocen métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados (véase, por ejemplo Junghans *et al.*, en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y los documentos US 4,681,581, US 4,735,210, US 5,101,827, US 5,102,990 (US RE35,500), US 5,648,471 y US 5,697,902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse mediante un método de cloramina T (Lindgren, S. *et al.* (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate," *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665; Kurth, M. *et al.* (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor," *J. Med. Chem.* 36(9):1255-1261; Rea, D.W. *et al.* (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors," *Cancer Res.* 50(3 Suppl):857s-861s).

La invención también proporciona anticuerpos antisortilina y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que están marcados de forma detectable utilizando una etiqueta fluorescente (tal como un quelato de tierras raras (por ejemplo, un quelato de europio)), una etiqueta de tipo fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína diclorotriazinilamina), una etiqueta de tipo rodamina (por ejemplo, ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen), TAMRA® o cloruro de dansilo), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), ficoeritrina; umbeliferona, Lissamina; una cianina; una ficoeritrina, Texas Red, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) o un análogo de los mismos, todos los cuales son adecuados para la detección óptica. Pueden emplearse marcadores quimioluminiscentes (por ejemplo, luminol, luciferasa, luciferina y aequorina). Dicho diagnóstico y detección también pueden realizarse acoplando la molécula de diagnóstico de la presente invención con sustancias detectables incluyendo, pero sin limitación, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o acetilcolinesterasa, o con complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina.

Pueden emplearse etiquetas quimioluminiscentes (por ejemplo, luminol, luciferasa, luciferina y aequorina). Dicho diagnóstico y detección también pueden conseguirse acoplando la molécula de diagnóstico de la presente invención a sustancias detectables que incluyen, pero no se limitan a, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa, o acetilcolinesterasa, o a complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina. También pueden emplearse marcadores paramagnéticos y se detectan preferiblemente usando tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT). Dichos marcadores paramagnéticos incluyen, pero no se limitan a compuestos que contienen iones paramagnéticos de aluminio (Al), bario (Ba), calcio (Ca), cerio (Ce), disprosio (Di), erbio (Er), europio (Eu), gadolinio (Gd), holmio (Ho), iridio (Ir), litio (Li), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (M), neodimio (Nd), osmio (Os), oxígeno (O), paladio (Pd), platino (Pt), rodio (Rh), rutenio (Ru), samario (Sm), sodio (Na), estroncio (Sr), terbio (Tb), tulio (Tm), estaño (Sn), titanio (Ti), tungsteno (W) y circonio (Zi), y particularmente, Co^{+2} , Cr^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Ni^{+2} , Ti^{+3} , V^{+3} y V^{+4} , metales de emisión de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Así, en una realización, el anticuerpo anti-Sortilina o el fragmento de unión a Sortilina del mismo de la invención puede marcarse con una etiqueta fluorescente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta paramagnética, una etiqueta radioisotópica o una etiqueta enzimática. El anticuerpo o fragmento marcado puede usarse para la detección o medición de la presencia o cantidad de dicha sortilina en el cerebro de un sujeto. Este método puede comprender la detección o medición de formación de imágenes *in vivo* de anticuerpo anti-sortilina o fragmento de

unión a sortilina unido a dicha sortilina y puede comprender la formación de imágenes *ex vivo* de dicho anticuerpo anti-sortilina o fragmento de unión a sortilina unido a dicha sortilina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que codifica una o más cadenas polipeptídicas de un anticuerpo de la invención o un dominio de unión a antígeno del mismo. Dichos vectores de expresión pueden usarse para la producción recombinante de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la invención.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector de ADN o ARN adecuado, incluidos los vectores cromosómicos, no cromosómicos y de ácido nucleico sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico codificador de anticuerpo anti-Sortilina está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en US 6,077,835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico como pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo «midge» (tal como se describe, por ejemplo, en Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con CaPO₄ (como se describe, por ejemplo, en WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

En una realización, el vector es adecuado para la expresión de anticuerpos anti-Sortilina o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en una célula bacteriana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison, WI) y similares.

Un vector de expresión puede ser también o como alternativa un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como el factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley InterScience New York (1987), Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987), Mattanovich, D. et al. *Methods Mol. Biol.* 824, 329-358 (2012), Celik, E. et al. *Biotechnol. Adv.* 30(5), 1108-1118 (2012), Li, P. et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142(2), 105-124 (2007), Böer, E. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(3), 513-523 (2007), van der Vaart, J.M. *Methods Mol. Biol.* 178, 359-366 (2002), y Holliger, P. *Methods Mol. Biol.* 178, 349-357 (2002)).

En un vector de expresión de la invención, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-Sortilina pueden comprender o estar asociados con cualquier promotor, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión adecuados. Los ejemplos de dichos elementos incluyen promotores fuertes de la expresión (por ejemplo, el promotor/potenciador IE de CMV humano (CMV IE), así como promotores LTR de VRS, SV40, SL3-3, VTMR, y VIH), secuencias de terminación eficaz de poli (A), un origen de replicación para el producto de plásmido en *E. coli*, un gen de resistencia a antibiótico como marcador de selección y/o un sitio conveniente de clonación (por ejemplo, un poliligador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en lugar de un promotor constitutivo tal como IE de CMV (el experto en la técnica reconocerá que dichos términos actualmente describen un grado de expresión génica en determinadas condiciones).

En un aspecto aún mayor, la invención se refiere a una célula huésped recombinante eucariota o procariota, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención tal como se define en el presente documento o una molécula biespecífica de la invención tal como se define en el presente documento. Los ejemplos de células huésped incluyen levaduras, bacterias y células de mamífero, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de forma estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica para la expresión de un anticuerpo anti-sortilina de la presente invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido, o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica para la expresión de un anticuerpo anti-sortilina, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo antisortilina de la invención, dicho método comprende los pasos de a) cultivar un hibridoma o una célula huésped de la invención como se describe en el presente documento, y b) purificar el anticuerpo de la invención a partir de los medios de cultivo.

En una realización, la invención se refiere a una preparación que, tal como se utiliza dicho término en el presente documento, comprende un anticuerpo anti-Sortilina tal como se define en el presente documento, y que está

sustancialmente libre de anticuerpos de origen natural que no son capaces de unirse a sortilina o que no alteran materialmente la funcionalidad anti-Sortilina de la preparación. Por tanto, una preparación de este tipo no incluye suero que surge de forma natural, o un derivado purificado a partir de dicho suero, que comprende una mezcla de un anticuerpo anti-sortilina y otro anticuerpo que no altera la funcionalidad del anticuerpo anti-sortilina de la preparación, donde dicha funcionalidad es:

- (i) una afinidad de unión (K_D) para la Sortilina;
- (ii) una capacidad para reducir y/o inhibir la unión de PGRN a Sortilina;
- (iii) una capacidad para reducir y/o inhibir el aclaramiento de PGRN por las células que expresan Sortilina;
- (iv) una capacidad para reducir y/o inhibir la endocitosis de PGRN por células que expresan Sortilina;
- (v) capacidad de aumentar la cantidad y/o concentración de PGRN en el plasma en ratones knock-in que expresan Sortilina humana; capacidad de aumentar la cantidad y/o concentración de PGRN en el cerebro y/o
- (vi) capacidad, cuando se administra de forma crónica, para proporcionar tratamiento de la demencia frontotemporal (DFT) y/o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La invención se refiere en particular a preparaciones de dicho anticuerpo antisortilina que tienen un cambio estructural en su secuencia de aminoácidos (en cualquiera de sus CDRs, dominios variables, residuos marco y/o dominios constantes) en relación con la estructura de un anticuerpo antisortilina natural, donde dicho cambio estructural hace que el anticuerpo monoclonal antisortilina muestre una funcionalidad marcadamente alterada (es decir, más de un 20 % de diferencia, más de un 40 % de diferencia, más de un 60 % de diferencia, más de un 80 % de diferencia, más de un 100 % de diferencia, más de un 150 % de diferencia, más de 2 veces de diferencia, más de 4 veces de diferencia, más de 5 veces de diferencia, o más de 10 veces de diferencia en funcionalidad) en relación con la funcionalidad exhibida por dicho anticuerpo antisortilina de origen natural; en el que dicha funcionalidad es:

- (i) una afinidad de unión (K_D) para la Sortilina;
- (ii) una capacidad para reducir y/o inhibir la unión de PGRN a Sortilina;
- (iii) una capacidad para reducir y/o inhibir el aclaramiento de PGRN por las células que expresan Sortilina;
- (iv) una capacidad para reducir y/o inhibir la endocitosis de PGRN por células que expresan Sortilina;
- (v) una capacidad para aumentar la cantidad y/o concentración de PGRN en el plasma en ratones knock-in que expresan Sortilina humana;
- (vi) una capacidad para aumentar la cantidad y/o concentración de PGRN en el cerebro y/o
- (vii) una capacidad para aumentar la cantidad y/o concentración de PGRN en el cerebro y/o

(vi) capacidad, cuando se administra de forma crónica, para proporcionar tratamiento de la demencia frontotemporal (DFT), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y/o la enfermedad de Alzheimer (EA).

especialmente donde dicha funcionalidad alterada es el resultado del cambio estructural y por lo tanto es inseparable del mismo.

El término "sustancialmente libre" de anticuerpos de formación natural se refiere a la ausencia completa de dichos anticuerpos de formación natural en dichas preparaciones, o a la inclusión de una concentración de dichos anticuerpos de formación natural en dichas preparaciones que no afecte materialmente a las propiedades de unión a Sortilina de las preparaciones. Se dice que un anticuerpo está "aislado" si no tiene un homólogo de origen natural o ha sido separado o purificado de los componentes que lo acompañan de forma natural.

El término "anticuerpos de aparición natural", en relación con estos preparados, se refiere a los anticuerpos (incluidos los autoanticuerpos de aparición natural) provocados en seres humanos vivos u otros animales, como consecuencia natural del funcionamiento de sus sistemas inmunitarios.

Así pues, los preparados de la presente invención no excluyen, y de hecho abarcan explícitamente, dichos preparados que contienen un anticuerpo anti-Sortilina y un anticuerpo adicional añadido deliberadamente capaz de unirse a un epítipo que no posee la Sortilina. Tales preparaciones incluyen particularmente realizaciones de las mismas en las que la preparación presenta eficacia potenciada en el tratamiento de demencia frontotemporal (DFT) y/o esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Los anticuerpos de fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención pueden producirse en diferentes líneas celulares, tal como una línea celular humana, una línea celular no humana de mamífero y una línea celular de insecto, por ejemplo una línea celular CHO, una línea celular HEK, una línea celular BHK-21, una

línea celular murina (tal como una línea celular de mieloma), una línea celular de fibrosarcoma, una línea celular PER.C6, una línea celular HKB-11, una línea celular CAP y una línea celular humana HuH-7 (Dumont et al, 2015, Crit Rev Biotechnol. Sep 18:1-13., cuyo contenido se incluye en el presente documento por referencia).

En aspectos adicionales, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- 5 (i) un anticuerpo anti-Sortilina o un fragmento de unión a antígeno del mismo, ambos según se definen en el presente documento, o un preparado, según se define dicho término en el presente documento, que comprenda dicho anticuerpo anti-Sortilina o fragmento de unión a antígeno del mismo; y
- (ii) un soporte farmacéuticamente aceptable.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con otros adyuvantes y excipientes conocidos, de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22a edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

15 Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualesquiera otros adyuvantes y excipientes conocidos, deben ser adecuados para el compuesto elegido de la presente invención y el modo de administración elegido. La idoneidad de portadores y otros componentes de composiciones farmacéuticas se determina basándose en la ausencia de impactos negativos significativos sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto elegido o composición farmacéutica de la presente invención (por ejemplo, menos de un impacto sustancial (inhibición relativa del 10% o menor, inhibición relativa del 5% o menor, etc.)) sobre la unión del epítipo.

20 Una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, como Tween-20 o Tween- 80), estabilizadores (por ejemplo, azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica. El diluyente se selecciona para no afectar a la actividad biológica de la combinación. Algunos ejemplos de dichos diluyentes son el agua destilada, la solución salina fisiológica tamponada con fosfato, las soluciones de Ringer, la solución de dextrosa y la solución de Hank.

25 Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros portadores o estabilizadores y similares no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos. Las composiciones también pueden incluir macromoléculas grandes de metabolismo lento, tales como proteínas, polisacáridos como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (por ejemplo, látex, Sepharose, agarosa, celulosa y similares funcionalizadas), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (por ejemplo, gotitas de aceite o liposomas).

30

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones farmacéuticas particulares empleadas de la presente invención, o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, estado general de salud y antecedentes clínicos previos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

35

40 La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados, incluyendo: parenteral, tópica, oral o intranasal para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en el presente documento significan otros modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen la inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal. Se conocen bien en la técnica vías de administración adicionales de administrar un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* y los expertos habituales en la técnica pueden seleccionarlas. En una realización esa composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

50

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

55 Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de

algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo, y/o diversos tampones. Otros portadores se conocen bien en las técnicas farmacéuticas.

5 Los soportes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

10 La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tal como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tal como palmitato de ascorbilo, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tal como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tal como azúcares, polialcoholes, tal como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tal como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto frente a la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, 25 incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Dichos portadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biocompatibles biodegradables tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico) solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones se conocen, en general, por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo,, 30 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

35 En una realización, los compuestos de la presente invención pueden formularse para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Los portadores farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen disoluciones acuosas o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos complementarios.

40 Las composiciones farmacéuticas inyectables deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una disolución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión acuoso o no acuoso que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como 45 aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede propiciarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción del anticuerpo, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. 50 Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de componentes, por ejemplo, tal como se enumeró anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes necesarios por ejemplo, de entre los enumerados anteriormente. En el 55 caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, ejemplos de métodos de preparación son el secado a vacío y el secado por congelación (liofilización), que dan un polvo del principio activo más cualquier componente adicional deseado a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una microfiltración de esterilización. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, ejemplos de métodos de preparación son el secado a vacío y el secado por congelación (liofilización), que dan un polvo del principio activo más cualquier componente adicional deseado a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos descritos en el presente documento se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo individual, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o puede reducirse o aumentarse proporcionalmente la dosis tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de dosificación unitaria para la facilidad de la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas utilizables como dosificaciones unitarias para los sujetos que han de tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la presente invención están establecidas y dependen directamente de (a) las características exclusivas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que ha de conseguirse (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Las dosis eficaces y los regímenes de dosificación de los anticuerpos antisortilina dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la materia. Un intervalo a modo de ejemplo, no limitativo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención es de aproximadamente 0.1-10 mg/kg/peso corporal, tal como aproximadamente 0.1-5 mg/kg/peso corporal, por ejemplo aproximadamente 0.1-2 mg/kg/peso corporal, tal como aproximadamente 0.1-1 mg/kg/peso corporal, por ejemplo aproximadamente 0.15, aproximadamente 0.2, aproximadamente 0.5, aproximadamente 1, aproximadamente 1.5 o aproximadamente 2 mg/kg/peso corporal.

Un médico o veterinario experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz necesaria de la composición farmacéutica. Por ejemplo, el médico o veterinario puede iniciar las dosis del anticuerpo anti-sortilina empleado en la composición farmacéutica a niveles menores de los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta lograrse el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la presente invención será la cantidad de compuesto que es la dosis mínima eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser por ejemplo intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y administrarse por ejemplo de forma proximal al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, en formas de dosificación unitarias. Aunque es posible administrar un compuesto de la presente invención solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica, tal como se describió anteriormente.

Los anticuerpos marcados o sus fragmentos de unión a antígenos de la invención pueden utilizarse con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o controlar enfermedades o trastornos. La invención proporciona la detección o diagnóstico de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo o cognitivo, incluyendo pero no limitado a DFT, ELA o proteinopatías TDP43 tal como la Enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende: (a) someter a ensayo la existencia de fragmentos A β piroglutamatados en células o muestras de tejido de un sujeto usando uno o más anticuerpos que se unen de forma específica a sortilina; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normal de tal forma que un aumento en el nivel sometido a ensayo de antígeno comparado con el nivel de control de antígeno es indicativo de la enfermedad o el trastorno, o indicativo de la gravedad de la enfermedad o el trastorno.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden utilizarse para analizar Sortilina o fragmentos de unión a antígeno de Sortilina en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistoquímicos bien conocidos en la técnica. Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar proteínas incluyen inmunoensayos tal como el inmunoensayo enzimático (ELISA) y el ensayo de radioinmunoensayo (RIA) y ensayos basados en plataformas de descubrimiento a mesoescala (MSD). Los marcadores de anticuerpo adecuados pueden usarse en dichos kits y métodos, y los marcadores conocidos en la técnica incluyen marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa; marcadores de radioisótopos tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In) y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); y marcadores luminiscentes tales como luminol y luciferasa; y marcadores fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina.

La presencia de anticuerpos anti-Sortilina marcados o de sus fragmentos de unión a Sortilina puede detectarse in vivo con fines diagnósticos. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar a un sujeto una cantidad

- eficaz de dicha molécula marcada; b) esperar un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre en sitios (si los hay) de deposición de A β y permitir que la molécula marcada no unida se elimine hasta un nivel de fondo; c) determinar un nivel de fondo; y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de tal forma que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de fondo es indicativa de que el sujeto tiene la enfermedad o el trastorno, o es indicativa de la gravedad de la enfermedad o el trastorno. Según dicha realización, la molécula se marca con un resto de formación de imágenes adecuado para la detección usando un sistema de formación de imágenes particular conocido por los expertos en la técnica. Los niveles de fondo pueden determinarse por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo la comparación de la cantidad de anticuerpo marcado detectado con un valor convencional determinado previamente para un sistema de formación de imágenes particular. Los métodos y sistemas que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero no se limitan a, tomografía computerizada (TC), exploración de cuerpo entero tal como tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) y sonografía.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, para su uso en medicina.

- En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con niveles disminuidos de PGRN en el cerebro de un paciente,

- En otro aspecto, la invención se refiere al uso del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad asociada con niveles disminuidos de PGRN en el cerebro de un paciente,

Se prefiere que en los usos y métodos de esos aspectos de la invención la enfermedad sea: DFT; ELA; o proteinopatías TDP43, tal como la EA.

Preferiblemente, en los usos y métodos de dichos aspectos de la invención, el tratamiento es crónico, y es preferiblemente durante al menos 2 semanas, tal como al menos durante 1 mes, 6 meses, 1 año o más.

- En aspectos adicionales, la invención proporciona un kit que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención.

Tabla 5 - Secuencias de anticuerpos

Ab 5E1	
SEQ ID NO: 1	5E1 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO: 2	5E1 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO: 3	5E1 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO: 4	5E1 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO: 5	5E1 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO: 6	5E1 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO: 7	5E1 VL
SEQ ID NO: 8	5E1 VH
Ab 1F2	
SEQ ID NO: 9	1F2 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO: 10	1F2 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO: 11	1F2 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO: 12	1F2 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO: 13	1F2 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO: 14	1F2 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO: 15	1F2 VL
SEQ ID NO: 16	1F2 VH
Ab 068	
SEQ ID NO: 17	068 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO: 18	068 CDR2 Cadena ligera

Ab 068		
SEQ ID NO:	19	068 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	20	068 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	21	068 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	22	068 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	23	068 VL
SEQ ID NO:	24	068 VH
Ab 1320		
SEQ ID NO:	25	1320 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	26	1320 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	27	1320 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	28	1320 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	29	1320 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	30	1320 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	31	1320 VL
SEQ ID NO:	32	1320 VH

Ab 93-05		
SEQ ID NO:	33	93-05 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	34	93-05 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	35	93-05 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	36	93-05 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	37	93-05 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	38	93-05 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	39	93-05 VL
SEQ ID NO:	40	93-05 VH
Ab 93-01		
SEQ ID NO:	41	93-01 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	42	93-01 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	43	93-01 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	44	93-01 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	45	93-01 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	46	93-01 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	47	93-01 VL
SEQ ID NO:	48	93-01 VH

Ab 924		
SEQ ID NO:	49	924 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	50	924 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	51	924 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	52	924 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	53	924 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	54	924 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	55	924 VL

Ab 924		
SEQ ID NO:	56	924 VH
Ab 1276		
SEQ ID NO:	57	1276 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	58	1276 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	59	1276 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	60	1276 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	61	1276 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	62	1276 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	63	1276 VL
SEQ ID NO:	64	1276 VH

Ab 849		
SEQ ID NO:	65	849 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	66	849 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	67	849 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	68	849 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	69	849 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	70	849 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	71	849 VL
SEQ ID NO:	72	849 VH
Ab 531-02		
SEQ ID NO:	73	531-02 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	74	531-02 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	75	531-02 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	76	531-02 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	77	531-02 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	78	531-02 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	79	531-02 VL
SEQ ID NO:	80	531-02 VH

Ab 548-01		
SEQ ID NO:	81	548-01 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	82	548-01 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	83	548-01 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	84	548-01 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	85	548-01 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	86	548-01 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	87	548-01 VL
SEQ ID NO:	88	548-01 VH
Ab 548-02		
SEQ ID NO:	89	548-02 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	90	548-02 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	91	548-02 CDR3 Cadena ligera

Ab 548-01		
SEQ ID NO:	92	548-02 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	93	548-02 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	94	548-02 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	95	548-02 VL
SEQ ID NO:	96	548-02 VH

Ab1289-02		
SEQ ID NO:	97	1289-02 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	98	1289-02 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	99	1289-02 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	100	1289-02 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	101	1289-02 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	102	1289-02 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	103	1289-02 VL
SEQ ID NO:	104	1289-02 VH

Ab 811-02		
SEQ ID NO:	105	811-02 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	106	811-02 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	107	811-02 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	108	811-02 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	109	811-02 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	110	811-02 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	111	811-02 VL
SEQ ID NO:	112	811-02 VH

Ab 566-01		
SEQ ID NO:	113	566-01 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	114	566-01 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	115	566-01 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	116	566-01 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	117	566-01 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	118	566-01 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	119	566-01 VL
SEQ ID NO:	120	566-01 VH

Ab 562		
SEQ ID NO:	121	562 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	122	562 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	123	562 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	124	562 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	125	562 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	126	562 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	127	562 VL
SEQ ID NO:	128	562 VH

Ab 193		
SEQ ID NO:	129	193 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	130	193 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	131	193 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	132	193 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	133	193 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	134	193 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	135	193 VL
SEQ ID NO:	136	193 VH
Ab 88		
SEQ ID NO:	137	88 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	138	88 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	139	88 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	140	88 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	141	88 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	142	88 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	143	88 VL
SEQ ID NO:	144	88 VH

Ab 045		
SEQ ID NO:	145	045 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	146	045 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	147	045 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	148	045 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	149	045 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	150	045 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	151	045 VL
SEQ ID NO:	152	045 VH
Ab 044		
SEQ ID NO:	153	044 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	154	044 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	155	044 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	156	044 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	157	044 CDR2 Cadena pesada
SEQ ID NO:	158	044 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	159	044 VL
SEQ ID NO:	160	044 VH

Ab 002		
SEQ ID NO:	161	002 CDR1 Cadena ligera
SEQ ID NO:	162	002 CDR2 Cadena ligera
SEQ ID NO:	163	002 CDR3 Cadena ligera
SEQ ID NO:	164	002 CDR1 Cadena pesada
SEQ ID NO:	165	002 CDR2 Cadena pesada

Ab 002		
SEQ ID NO:	166	002 CDR3 Cadena pesada
SEQ ID NO:	167	002 VL
SEQ ID NO:	168	002 VH
SEQ ID NO:	169	Isoforma de secuencia de sortilina humana completa
SEQ ID NO:	170	"Región D" identificada por la presente invención
SEQ ID NO:	171	Sortilina "hSORTECDBAP"
SEQ ID NO:	172	SORTECDBAP_hBACK de sortilina
SEQ ID NO:	173	SORTECDBAP_tetra de sortilina
SEQ ID NO:	174	SORTECDBAP_hB01-05 de sortilina
SEQ ID NO:	175	SORTECDBAP_hRIM de sortilina
SEQ ID NO:	176	SORTECDBAP_hB06-10 de sortilina
SEQ ID NO:	177	SORTECDBAP_hB12390 de sortilina
SEQ ID NO:	178	SORTECDBAP_hB45678 de sortilina
SEQ ID NO:	179	SORTECD_HIS de sortilina
SEQ ID NO:	180	"Región A" según la presente invención
SEQ ID NO:	181	Región A 109-114
SEQ ID NO:	182	Región A 126-153
SEQ ID NO:	183	Región A 126-144
SEQ ID NO:	184	Región A 154-159
SEQ ID NO:	185	Región D 570-572
SEQ ID NO:	186	Región D 588-597
SEQ ID NO:	187	Región D 593-597
SEQ ID NO:	188	Secuencias usadas para HDX

El listado o el comentario en esta memoria descriptiva de un documento publicado aparentemente anterior no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento forma parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

- 5 A continuación se describirán, con referencia a las figuras adjuntas, ejemplos preferidos no limitativos que encarnan ciertos aspectos de la invención.

EJEMPLOS

Los ejemplos 1-3 describen la generación de constructos de sortilina

El **ejemplo 1** divulga las construcciones de lanzadera. El **ejemplo 2** da a conocer la expresión de constructos de sortilina. El **ejemplo 3** divulga la purificación de construcciones de sortilina.

- 10 Los ejemplos 4-7 describen la generación de anticuerpos frente a sortilina

El **ejemplo 4** divulga la inmunización y los hibridomas. El **ejemplo 5** da a conocer el análisis de secuencias. El **ejemplo 6** da a conocer la purificación de anticuerpos. El **ejemplo 7** da a conocer la generación de anticuerpos de ratón.

Los ejemplos 8-17 describen la caracterización de anticuerpos frente a sortilina

- 15 El **ejemplo 8** divulga la unión a sortilina. El **ejemplo 9** da a conocer la capacidad de bloqueo cruzado de anticuerpos frente a sortilina. El **ejemplo 10** divulga la unión HTRF PGRN-sortilina. El **ejemplo 11** divulga la unión de NTS. El **ejemplo 12** divulga la unión y endocitosis celular de PGRN. El **ejemplo 13** divulga niveles extracelulares de PGRN. El **ejemplo 14** divulga los niveles de iPSC PGRN. El **ejemplo 15** divulga unos niveles plasmáticos de PGRN. El **Ejemplo 16** divulga el mapeo de epítomos mediante HDX. El **ejemplo 17** divulga
20 microdiálisis de PGRN en el cerebro.

Ejemplo 1

Para utilizarlos tanto en el procedimiento de cribado de hibridomas como en la diversificación del panel de anticuerpos, se diseñaron, construyeron y produjeron las denominadas "construcciones de lanzadera", que constituyen un conjunto de moléculas quiméricas de sortilina que contienen secuencias de aminoácidos derivadas tanto de la sortilina humana como de una especie lejanamente emparentada (tetraodon) con una homología de secuencia significativamente reducida. La justificación era que la estructura global de sortilina y la funcionalidad de estos constructos quiméricos se conservarían pero que la pérdida de unión de anticuerpos a determinados constructos quiméricos indicaría la implicación de las regiones intercambiadas específicas en la unión. Las construcciones solubles de la región extracelular (ECD, aa 1-755) se marcaron con una etiqueta BAP (péptido aceptor de biotina), que permitía la biotinylación "in vitro" de las proteínas mediante la coexpresión de biotina ligasa, o con una etiqueta His, que facilitaba la purificación. Se prepararon vectores de expresión que codificaban para las siguientes proteínas: SORT-ECDBAP, SORT-ECDBAP-hB01-05, SORT-ECDBAP-hB06-10, SORT-ECDBAP-hB12390, SORT-ECDBAP-hB45678, SORT-ECDBAP-tetra, SORT, SORT-tetra.

Las secuencias de Sortilina se pueden encontrar en la SEQ ID NOs: 169-180 y la Figura 2 muestra la presentación esquemática de la asignación de regiones de los anticuerpos basada en la unión a las construcciones de lanzadera Sortilina.

Ejemplo 2

En el caso de la expresión de anticuerpos, los vectores apropiados de cadena pesada y cadena ligera, como se describe en los Ejemplos 4, 5 y 6, se coexpresaron en células HEK-293F.

Ejemplo 3: Purificación de sortilina con etiqueta de His

SORTECDHis se expresó en células HEK-293F. La etiqueta de His en las proteínas permite la purificación con cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. En este procedimiento, se equilibra un cartucho NiNTA Superflow (Qiagen) con NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM, pH 8.0. Se carga la columna con proteína con etiqueta de His con un tiempo de residencia de 1 minuto. Se lava la columna con NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM, pH 8.0. Se eluye la proteína con NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 250 mM, pH 8.0. Posteriormente, se dializa la proteína frente a PBS usando un casete Slide-A-Lyzer con un punto de corte de 10.000 de MWCO (Thermo Scientific). Después de dializar la proteína se esteriliza por filtración usando un filtro SFCA de 0.2 micrómetros (Thermo Scientific).

La línea celular S18-HEK se generó transfectando células HEK293 con un vector de expresión de sortilina humana de tipo salvaje (WT). Se derivaron células transfectadas estables después del pase en presencia de un agente de selección. Se seleccionaron clones individuales mediante clonación por dilución. Se caracterizaron los clones para determinar la expresión de ARNm de sortilina usando QPCR. Los clones de mayor expresión se analizaron después por FACS (Guava, Millipore) utilizando un anticuerpo policlonal antisortilina (Polyclonal Goat Sortilin Biotinylated Ab, Cat.No: BAF2934_(R&D Systems)) para determinar los niveles de Sortilina expresados en superficie.

Ejemplo 4

A - Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

Los anticuerpos HuMAb Sortilin se derivaron de las inmunizaciones de las cepas de ratón HuMAb HCo12, HCo17, HCo20, HCo12-BALB/c, HCo17-BALB/c y HCo20-BALB/c (anticuerpo monoclonal humano; Medarex Inc., San Jose, CA, EE.UU.). Estos ratones son doble knock out para la inmunoglobulina (Ig) pesada de ratón y la cadena ligera kappa de ratón, lo que inactiva sustancialmente la expresión de anticuerpos que son completamente murinos. Las diversas cepas de ratón se hicieron transgénicas mediante la inserción de loci de cadena ligera kappa de Ig humana y cadena pesada de Ig humana y difieren en el número de genes VL (dominio variable de cadena ligera) y VH (dominio variable de cadena pesada) humanos. Se derivaron ratones HCo12-BALB/c mediante fecundación cruzada con ratones KCo5-BALB/c (transgénicos para la cadena ligera kappa).

48 ratones fueron inmunizados alternativamente por vía intraperitoneal (IP) con 20 µg de SORTECDHis (la SEQ ID NO: 179) y por vía subcutánea (SC, en la base de la cola) con la misma proteína, con un intervalo de 14 días. Se realizó un máximo de ocho inmunizaciones, 4 por vía i.p. y 4 por vía s.c.

En un protocolo, la primera inmunización se realizó con SORTECDHis en adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.), las siguientes inmunizaciones en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Un segundo protocolo usó SAS como adyuvante en todas las etapas de inmunización. Cuando se comprobó que los títulos séricos eran suficientes (dilución del suero de 1/50 o inferior positiva en el ensayo de cribado específico del antígeno en al menos dos cribados bisemanales consecutivos), los ratones se reforzaron adicionalmente dos veces por vía intravenosa (IV) con 10 µg de proteína SORTECDHis en 100 µl de PBS, cuatro y tres días antes de la fusión.

B - Generación de hibridoma de AcMhu

Los ratones HuMAb con un desarrollo suficiente de títulos específicos de antígeno según lo definido anteriormente fueron sacrificados y se recogieron el bazo y los ganglios linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de esplenocitos y células de ganglios linfáticos con una línea celular de mieloma de ratón se realizó mediante electrofusión utilizando un sistema de electrofusión CEEF 50 (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, EE.UU.), siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. Las células fusionadas se sembraron en un medio de fusión que contenía un 10 % de suero bovino fetal clon I (Perbio), 1 mM de piruvato sódico (Cambrex), 0.5 U/ml de penicilina, 0.5 U/ml de estreptomina (Cambrex), 50 µM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen), 600 ng/ml de interleucina 6 (IL-6) (Strathmann), 1 x HAT (Sigma) y 0.5 mg/ml de kanamicina (Invitrogen) en HyQ mADCF-Mab (Perbio). Después de diez días, se recogió el sobrenadante y se renovaron las células con medio de recogida, que contenía suero bovino fetal Clon I al 10%, 0.5 U/ml de penicilina, 0.5 U/ml de estreptomina, 600 ng/ml de IL-6 y proHT 1 x (Cambrex) en HyQ mADCF-Mab. Se examinaron los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma mediante ensayos de examen primario y perlas de estreptavidina acopladas a SORTECDBAP (SEQ ID NO 171), SORTECDBAPh06-10 (SEQ ID NO 176), SORTECDBAPh12390 (SEQ ID NO 177), para detectar hibridomas que producen anticuerpos anti-sortilina humanos (o quiméricos). Se sembraron células de hibridoma de los mejores pocillos primarios en medio semisólido compuesto por CloneMedia al 40% (Genetix, Hampshire, R.U.) y medio completo HyQ 2 x al 60% (Hyclone, Waltham, EE.UU.). Para cada pocillo primario, se sembró un pocillo de una placa negra Genetix de 6 pocillos. A partir de cada pocillo se escogieron 25 subclones usando el sistema ClonePix (Genetix). Se escogieron los subclones en medio de recogida. Después de siete días, se examinaron de nuevo los sobrenadantes de los subclones con respecto a la unión de IgG humana específica de sortilina y se midió la concentración de IgG humana usando Octet 384red (Fortebio, Menlo Park, EE.UU.). A partir de cada pocillo primario, se seleccionó el mejor subclón y se expandió en medio de expansión que contenía solo 600 ng/ml de IL-6, 0.5 U/ml de penicilina, 0.5 U/ml de estreptomina y proHT 1 x. Se expandieron los subclones a partir de un pocillo de la placa de 96 pocillos a un pocillo de la placa de 24 pocillos a cuatro pocillos de la placa de 24 pocillos a seis pocillos de la placa de 6 pocillos. Los clones derivados mediante este procedimiento se denominaron clones primarios (PC).

Se identificaron los anticuerpos HuMAb antisortilina de la invención y se sometieron a un análisis de secuencia.

Ejemplo 5: Análisis de secuencia de los dominios variables de AcMhu específicos de sortilina y clonación en vectores de expresión

Se preparó ARN total a partir de 0.2 a 5x10⁶ células de hibridoma y se preparó ADN complementario 5'-RACE (ADNc) a partir de 100 ng de ARN total, utilizando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), según las instrucciones del fabricante. Se amplificaron las regiones codificantes de VH y VL mediante PCR y se clonaron directamente, en marco, en los vectores de expresión p33G1f y p33Kappa (que contenían las secuencias codificantes del dominio constante IgG1/kappa humano), mediante clonación independiente de ligamiento (Aslanidis, C. y P. J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990;18(20): 6069-74). Para cada anticuerpo, se secuenciaron 16 clones VL y 16 clones VH. Se seleccionaron clones con un marco de lectura abierto (ORF) para el estudio y la expresión adicionales. Se coexpresaron de forma transitoria vectores de todas las combinaciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras en células FreesileTM 293-F usando 293fectin.

Las secuencias resultantes se muestran en el listado de secuencias (**la SEQ ID NOs:1-168**) del presente documento. Las secuencias CDR se definieron de acuerdo con las directrices publicadas.

Ejemplo 6: Purificación de anticuerpos

El sobrenadante del cultivo se filtró en filtros sin salida de 0.2 µm, se cargó en columnas de proteína A de 5 ml (rProtein A FF, Amersham Bioscience) y se eluyó con ácido cítrico-NaOH 0.1 M, pH 3. El eluido se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2M, pH 9 y se dializó a 12.6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7.4 (B.Braun), O/N (durante la noche). Después de la diálisis, se esterilizaron las muestras por filtración sobre filtros "dead-end" de 0.2 µm. Se determinó la pureza mediante SDS-PAGE y se midió la concentración mediante nefelometría y absorbancia a 280 nm. Se tomaron alícuotas de los anticuerpos purificados y se almacenaron a -80°C. Una vez descongeladas, se mantuvieron las alícuotas de anticuerpos purificados a 4°C. Se realizó espectrometría de masas para identificar la masa molecular de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo expresadas por los hibridomas.

Ejemplo 7: Generación de anticuerpos de ratón (1F2 y 5E1) Inmunógeno

Un gen sintético que codifica para el inmunógeno quimérico hSortilin-FC, (Sortilina humana AA (78-756) de **la SEQ ID NO:169**) e IgG1-FC humana AA (104-330) de **la SEQ ID NO:169** se clonó en pcDNA3.1 y se utilizó para su expresión utilizando el sistema estilo libre de Invitrogen. Se purificó el antígeno de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad con proteína-A usando procedimientos convencionales para la purificación de anticuerpos tal como se describió anteriormente para anticuerpos humanos.

Generación de hibridomas

Se utilizó hSortilin-FC como inmunógeno y se inmunizó a 5 ratones BALB/c. Se seleccionó un ratón con respuesta inmunitaria satisfactoria para la fusión celular y generación de hibridomas. Se examinaron los sobrenadantes con

hibridoma mediante ELISA usando sortilina-ECD como antígeno de recubrimiento. Se generaron un total de dieciocho líneas celulares de hibridoma derivadas de nueve clones parentales.

Expresión

- 5 Los hibridomas se cultivaron inicialmente en medio de crecimiento completo, DMEM con 10 %FBS+antibióticos, y posteriormente se adaptaron al medio CDhybridoma (Invitrogen) para los experimentos de expresión.

Purificación

Los anticuerpos monoclonales de ratón se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares de hibridoma mediante sefara de proteína-G según los procedimientos estándar recomendados por el proveedor (GE healthcare).

10 Ejemplo 8: Afinidad de AcMhu específicos de sortilina y anticuerpos de ratón frente a la región extracelular recombinante de sortilina

- La cinética de unión de los anticuerpos HuMab anti-Sortilina a la Sortilina se determinó utilizando Octet 384RED (ForteBio, Menlo Park, EE.UU.). Se prepararon disoluciones de AcMhu de 2 µg/ml mediante dilución en diluyente de muestra (ForteBio, n.º de art. 18-5028). Se humectaron previamente sensores Prot A (ForteBio, n.º de art. 18-0004) con tampón de cinética (diluyente de muestra en PBS 1:10) durante al menos 600 segundos. Posteriormente, se inmovilizaron los sensores con disolución de AcMhu durante 600 segundos. Se obtuvo una respuesta de nivel inicial A mediante inmersión en tampón de cinética durante 120 segundos. Se realizó la asociación de constructos SORTECD durante una incubación de 1000 segundos. Esto estuvo seguido por disociación en tampón de cinética durante 100 segundos. Después de la disociación, se regeneraron los sensores (glicina 10 mM, pH 1.0) y se neutralizaron (tampón de cinética) 3 veces durante 5 segundos. Se analizaron todos los AcMhu usando cuatro concentraciones de constructos SORTECD (10, 5, 2.5 y 1.25 µg/ml). Se usó un peso molecular de 76.8 kDa para SORTECDHis. Se ajustaron los datos con el software ForteBio Analysis 6.4, usando un ajuste completo global. Los resultados se muestran en **Figura 3 y Figura 4**.

Ejemplo 9: Bloqueo cruzado de anticuerpos anti-sortilina AcMhu

- 25 Los estudios de bloqueo cruzado de anticuerpos se realizaron con Octet 384RED (ForteBio, Menlo Park, EE.UU.). Se prepararon disoluciones de anticuerpo AcMhu de 2 µg/ml mediante dilución en diluyente de muestra (ForteBio, n.º de art. 18-5028). Se usaron sensores reactivos con amina (ForteBio, art.n.º 18-0008) para la inmovilización de los AcMhu. Antes del acoplamiento con los sensores reactivos con amina, se diluyeron los AcMhu en tampón MES, pH 6.0 (18-5027). El acoplamiento se realizó a 30°C y 1000 rpm de la siguiente manera: Los sensores reactivos a aminas se humedecieron previamente en PBS y posteriormente se activaron con EDC/NHS (ForteBio, Art.no. 18-1033/18-1034) (según las instrucciones del fabricante) durante 300 segundos. Los sensores activados se inmovilizaron con AcMhu durante 600 segundos. Se extinguieron los sensores inmovilizados para determinar la reactividad con amina restante con etanolamina (ForteBio, n.º de cat. 18-1039). Después de la extinción, se pusieron los sensores en PBS hasta su uso. El análisis de bloques cruzados comienza con el establecimiento de una respuesta de referencia a 30°C y 1000 rpm. Se obtuvo una respuesta de nivel inicial A mediante inmersión en diluyente de muestra durante 120 segundos. Se realizó la asociación de SORTECDHis durante 300 segundos seguida directamente por la asociación de AcMhu durante 300 segundos. Después de la asociación de AcMhu, se regeneraron los sensores (glicina 10 mM, pH 1.0) y se neutralizaron (diluyente de muestra) 3 veces durante 5 segundos. Se procesaron los datos usando el software ForteBio Analysis 6.4.
- 40 Los anticuerpos se agruparon en función de sus perfiles de unión en las diferentes construcciones de lanzadera Sortilina (**Figura 2, Figura 3 y Figura 4**). Para confirmar que todos los anticuerpos de la región D (y de la región F) se unen a la misma región del ECD de Sortilina humana de tipo salvaje, se caracterizó su capacidad para bloquear la unión de cada uno al ECD de Sortilina humana de tipo salvaje en un estudio de bloqueo cruzado utilizando el rojo Octet384. Por ejemplo, cuando se sometieron a prueba anticuerpos de la misma región, el anticuerpo primario bloquearía la unión del anticuerpo secundario y viceversa. Mientras tanto, cuando se sometieron a prueba anticuerpos de diferentes regiones, no habría bloqueo cruzado ya que sólo se bloquea una región por el anticuerpo primario y las regiones restantes están disponibles para que se una el anticuerpo secundario. **La figura 7** muestra que todos los anticuerpos D+ y frente a la región D producen bloqueo cruzado entre sí que confirma la clasificación de los anticuerpos a la región D y D+ basándose en constructos lanzadera.
- 50 Además, estos datos también confirman que los constructos quiméricos de sortilina conservan similitud con la sortilina humana de tipo natural-ECD.

Ejemplo 10: Caracterización de la unión de sortilina - ligando de PGRN en presencia de anticuerpos anti-sortilina.

- 55 Los valores IC50 para los anticuerpos se determinaron midiendo el desplazamiento de la unión de PGRN a Sortilina utilizando un ensayo de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF, CisBio), véase **Figura 5 y Figura 6**.

Los experimentos se realizaron en tampón de ensayo (50mM Fosfato, pH 7.0, 0.1 % BSA) en un volumen total de 20µl en una placa de microtitulación Greiner de 384 pocillos, blanca, de bajo volumen, (784075, Greiner).

Los anticuerpos se preincubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 50 nM de Sortilina ECD marcada con HIS y 4 nM de PGRN (SULU20110924) antes de añadir 7 nM de anti-6HIS-d2 y 0.7 nM de criptato anti-PGRN-Eu (Cisbio) diluidos en tampón conjugado (50 mM de fosfato, pH 7.0, 0.8 mM de KF, 0.1 % de BSA). Se usó neurotensina 20 µM como control positivo y se usó DMSO en tampón como control negativo.

La placa de ensayo se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C antes de leer la placa en el lector EnVision (Perkin Elmer).

La neurotensina no marcada y el blanco DMSO se utilizaron como controles positivo y negativo para el ensayo, respectivamente. Se realizó la evaluación de dosis-respuesta de anticuerpos con diez concentraciones entre 1 µM y 50 pM en una curva de dilución de 3 veces.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC50) se calculó mediante regresión no lineal utilizando una respuesta de concentración sigmoideal (pendiente variable) en XLfit 4 (IDBS, Reino Unido). (**Figuras 5 y 6**).

Ejemplo 11: Caracterización de la unión sortilina-neurotensina en presencia de anticuerpos antisortilina

El IC50 para el compuesto específico de Sortilina AF38469 (Schröder et al, Bioorg Med Chem Lett. 2014 Jan 1;24(1):177-80, 2014) se determinó midiendo el desplazamiento de la unión de ³H-Neurotensina a Sortilina mediante un ensayo de proximidad de centelleo (SPA).

Los experimentos se realizaron en tampón de ensayo (50mM HEPES, pH 7.4, 100mM NaCl, 2mM CaCl₂, 0.1 % BSA, 0.1 % Tween-20) en un volumen total de 40µl en una Optiplat de 384 pocillos, blanca opaca, (6007299, Perkin Elmer).

Se preincubaron 150nM de Sortilina marcada con HIS durante 15 minutos a temperatura ambiente con o sin 1µM de anticuerpo específico de Sortilina (IgG1-6003-045 o IgG1-6003-068) o con control de isotipo IgG1 humano antes de añadir las soluciones de proteína a los pocillos que contenían AF38469 en una serie de concentraciones de 50µM a 2.5nM. Se incubó la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente en un agitador antes de que se añadieran ³H-neurotensina 5 nM y perlas de formación de imágenes de quelato de Ni (RPNQ0266, Perkin Elmer). Se incubó el ensayo adicionalmente durante 60 min en las mismas condiciones.

Después de 6h, se leyó la placa en ViewLux (tiempo de exposición de 360s). Se usaron neurotensina no marcada y blanco de DMSO como controles positivo y negativo, respectivamente.

La evaluación dosis-respuesta del AF38469 se realizó con diez concentraciones entre 50µM y 2.5nM en una curva de dilución triple. La concentración inhibitoria semimáxima (IC50) se calculó mediante regresión no lineal utilizando la respuesta de concentración sigmoideal (pendiente variable) en *XLfit 4* (IDBS, Reino Unido). Los resultados pueden verse en la **figura 8**

Ejemplo 12: Caracterización de la unión de sortilina - ligando de PGRN en la superficie de las células en presencia de anticuerpos anti-sortilina.

En este ensayo se utilizaron tanto células transfectadas transitoriamente con Sortilina como la línea celular estable S18-HEK (células HEK que sobreexpresan Sortilina humana). Se tripsinizaron las células y se sembraron a una densidad de 42,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. En el caso de células transfectadas de manera transitoria, se sembraron las células 24 h después de la transfección en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se cambió el medio por completo y se añadieron los compuestos de prueba diluidos en medio a células durante 30 min. seguido por la adición de PGRN durante 4 h. Al final del estudio (después de 4.5 h), se fijaron las células y se tiñeron para PGRN. Se analizaron todas las placas teñidas mediante Cellomics Array Scan (Thermo Fischer) y se usó la intensidad de tinción promedio para PGRN/célula/pocillo para el análisis.

La PGRN utilizada en el ensayo se recogió de los medios tras la transfección transitoria de plásmidos de expresión de PGRN en células HEK 293. Se midieron los niveles de PGRN usando el kit de ELISA para PGRN (R&D).

La PGRN añadida a las células se unió y endocitotizó fácilmente, lo que produjo un aumento de la señal de fluorescencia en los pocillos transfectados con Sortilina. La adición de neurotensina, impidió la unión de sortilina a PGRN y la intensidad de fluorescencia de PGRN es similar a niveles de control, indicando que PGRN no se unió ni experimentó endocitosis en presencia de neurotensina.

Ambos Sortilin HumAbs (45 y 68) bloquearon la captación de PGRN con una eficacia similar a la neurotensina. El anticuerpo de control de isotipo, B12, no tuvo ningún efecto sobre la endocitosis o unión de PGRN. Los resultados pueden verse en la **figura 9**

Ejemplo 13: Efecto de los anticuerpos sobre los niveles extracelulares de PGRN

Se observó que tanto las células HEK293 como las células S18-HEK secretaban PGRN de forma continua al medio sin ningún tipo de estimulación.

Se añadieron anticuerpos y agentes de control a las células S18-HEK para evaluar el efecto sobre el PGRN. La adición de neurotensina, un ligando de sortilina peptídico conocido, o los anticuerpos humanos, 45, 68 y 811 a células S18-HEK condujo a un aumento de PGRN en el medio de cultivo celular. Dos de los anticuerpos frente a sortilina humana (45 y 68) tuvieron un efecto similar a neurotensina elevando los niveles de PGRN hasta el 202% y 201% respectivamente. El anticuerpo 811 aumentó PGRN hasta el 146% en el medio en comparación con los controles B12, se usó un anticuerpo de control de isotipo como control negativo en todos estos estudios y no mostró ningún efecto sobre los niveles de PGRN. Estas observaciones indican que los anticuerpos frente a sortilina sometidos a prueba inhibieron la internalización mediada por sortilina de PGRN, aumentando de ese modo la PGRN extracelular.

En el día 1, se sembraron células S18-HEK en una placa de 96 pocillos. Después de 24 h, se sustituyó el medio por completo por o bien medio solo (control) o bien medio complementado con compuesto de prueba. Se sometieron a prueba todos los compuestos a 10 μ M y los anticuerpos a 100 nM a menos que se especifique de otro modo. Se recogió el medio en el día 3 y se analizó usando ELISA para PGRN (R&D). Se evaluó la viabilidad celular mediante Cell TiterGlo (Pro Mega) para evaluar el efecto citotóxico de los compuestos. Se analizaron los niveles de PGRN en el medio mediante ELISA y se normalizaron los valores con respecto a los pocillos de control. Los resultados pueden verse en la **figura 10**

Ejemplo 14: Ensayo ELISA para la PGRN extracelular en iPSC

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) se generaron mediante reprogramación no integrativa de fibroblastos humanos (fibroblastos dérmicos humanos normales de varón de 18 años; Lonza) como se describe en otro lugar (Rasmussen et al., Stem Cell Reports. 9 de septiembre de 2014;3(3):404-13.). Se usó la línea NHDF K1_shp53 para estos estudios. Inicialmente se generaron las iPSC en medio mTESR y posteriormente se cultivaron en monocapa en Pluripro (Cell Guidance System). Se inició la diferenciación neuronal el día 0 volviendo a sembrar las células en placas recubiertas con poli-L-ornitina/laminina y cultivándolas en medio N3 (DMEM al 50 %/F12 + medio neurobasal al 50 % complementado con N2 al 0.5 %, B27 al 1 % con RA, GlutaMAX 0.5 mM, NEA al 0.5 %, 2-mercaptoetanol 50 μ M e insulina 2.5 mg/ml) con nogina 500 ng/ml y SB431542 10 μ M. Se renovó el medio cada día. Después de 11 días de inducción con nogina/SB431542, se dividieron las células con dispasa y volvieron a sembrarse sobre poli-L-ornitina/laminina en medio N3. Desde ese punto en adelante, se renovó el medio N3 cada 2-3 días y se dividieron las células aproximadamente cada 10-14 días usando Accutase.

Las células iPSC diferenciadas neuronalmente se colocaron en placas de 96 pocillos. Una semana después, se añadieron anticuerpos a las células. Los medios de las células se recogieron a las 48 o 96 horas y se analizaron mediante ELISA de PGRN humano (Enzo Life sciences) y las muestras se analizaron según las instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos Sortilina humanos probados (45 y 68) aumentaron los niveles de PGRN a distintos niveles en los medios a las 48 y 96 horas. B12 y Anti-Hel son los anticuerpos isotipo de control (control negativo). Se presentan los datos como la media \pm D.E. Los datos se analizaron mediante Anova unidireccional seguido del análisis de Dunnett * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Los resultados pueden verse en la **figura 12**

Ejemplo 15

Para analizar el efecto de los anticuerpos sobre los niveles de PGRN en plasma, se administró a ratones humanizados Sortilina KI una inyección única o múltiples inyecciones (10mg/kg) de los anticuerpos sortilina o control de isotipo mediante inyecciones subcutáneas. Se anestesiaron los animales y se sacrificaron en diversos puntos de tiempo después de la dosificación y se determinaron los niveles de PGRN en plasma mediante ELISA.

1. A. Estudio del curso temporal: Se trataron los ratones con anticuerpos (un AcMhu frente a sortilina o un Ac de control) y se sacrificaron en diferentes puntos de tiempo. Los ratones tratados con anticuerpos de control (anti-Hel), no mostraron cambio en PGRN en plasma mientras que en ratones tratados con AcMhu frente a sortilina 45, hubo un aumento en los niveles de PGRN que pareció alcanzar un máximo entre 24 y 48 h y luego disminuyeron gradualmente desde aproximadamente el día 4. Los niveles de PGRN estaban todavía elevados en el día 7.
2. B. Estudio subcrónico: Basándose en los datos del estudio de transcurso temporal, se les dosificó a los ratones KI para sortilina dos veces a la semana 10 mg/kg, por vía s.c., o bien anticuerpo frente a sortilina humana 45 o bien anticuerpo de control de isotipo, para mantener un nivel de anticuerpo estacionario para un estudio subcrónico (4 semanas). Se extrajeron muestras de sangre al inicio del estudio y cada semana para hacer un seguimiento de los cambios en PGRN en plasma. Los niveles de PGRN en plasma al inicio del estudio eran similares en ambos grupos de animales. Se observaron mayores niveles de PGRN en plasma en ratones tratados con anticuerpo frente a sortilina 45 desde la semana 1 y permanecieron elevados a lo largo de todo el estudio. Los ratones tratados con Ac de control, no mostraron ningún aumento en PGRN en plasma y permanecieron en los niveles iniciales (semana 0).

3. C. Estudio dosis-respuesta: Se inyectaron diferentes dosis (4 dosis: 10, 2, 0.4 y 0.1 mg/kg) del anticuerpo frente a sortilina (45) y de control (anti-Hel) y se sacrificaron los ratones en el día 2. PGRN en plasma se elevó con 10 mg/kg y 2 mg/kg en ratones tratados con AcMhu frente a sortilina y las dosis menores no tuvieron un efecto sobre la PGRN en plasma, lo que muestra claramente un efecto dependiente de la dosis del anticuerpo frente a sortilina sobre los niveles de PGRN en plasma. Los ratones tratados con anticuerpo de control no mostraron ningún cambio en los niveles de PGRN.

Se anestesió a los ratones con 0.4 ml de Avertin IP y se recogió sangre del corazón, que se transfirió a un vial de 500 µl de KEDTA. Se mantuvieron las muestras en hielo hasta que se centrifugaron a 3600 G durante 15 min a 4°C. Se pipeteó el plasma a un vial micrónico y se congeló a -20°C. La PGRN en las muestras se midió utilizando el kit ELISA PGRN (Adipogen) según las instrucciones del fabricante. Los resultados pueden verse en la **figura 13**

Ejemplo 16: Mapeo de epítomos de anticuerpos que seleccionan como diana la interacción progranulina-sortilina mediante intercambio de hidrógeno/deuterio seguido por espectrometría de masas

En el intercambio hidrógeno/deuterio seguido de espectrometría de masas (HDX-MS) se mide la tasa de intercambio de los hidrógenos amida del esqueleto de una proteína. De ese modo, es posible examinar con sonda la dinámica conformacional de todo el esqueleto de la proteína excepto en residuos de prolina. Se determina la tasa de la reacción de intercambio mediante el estado de los enlaces de hidrógeno de la amida del esqueleto y en menor medida su capacidad de acceso al disolvente. Pueden observarse cambios sutiles en estos dos parámetros por ejemplo provocados por la presencia de un ligando como un cambio en la incorporación de deuterio.

Para sublocalizar los cambios en la incorporación de deuterio, la proteína se trata con una proteasa estable a los ácidos (por ejemplo, pepsina), que genera regiones locales de entre diez y quince aminoácidos. Las regiones que muestran una perturbación en presencia de un ligando o bien están implicadas directamente en la superficie de contacto de unión o bien se ven afectadas de manera alostérica por el acontecimiento de unión.

Mapeo de epítomos de anticuerpos

La incorporación de deuterio de la región extracelular de Sortilina (**SEQ ID NO:188**) se midió en ausencia y presencia de mAb45, mAb68, mAb811 y un anticuerpo denominado mAb30 que no se une a la región D. Para garantizar que las mediciones se realizaban en condiciones estables, los complejos se equilibraron durante 15 minutos a 25°C antes de iniciar la reacción de intercambio. Se inició la reacción de intercambio mediante dilución de las muestras de proteína 1:9 (v/v) en tampón deuterado (D₂O al 99%, Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pDleído = 7.6). Después de diversos puntos de tiempo (15 s, 1 min, 10 min, 1 h y 8 h) se extinguió la reacción de intercambio mediante dilución 1:1 (v/v) con tampón de extinción enfriado con hielo (glicina 2 M, tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 0.8 M, pH = 2.3), aumentando de ese modo el pH hasta 2.46. Las muestras enfriadas se colocaron inmediatamente en un congelador a -80° C y se almacenaron hasta su análisis. Las muestras de control totalmente deuteradas se prepararon diluyendo las muestras de sortilina 1:9 (v/v) en un tampón de desnaturalización deuterado (cloruro de guanidinio 6M, 99 % D₂O, 20mM tris, 150mM NaCl, pDread = 7.6) seguido de una incubación a 25° C durante 16h antes de ser apagadas y manipuladas como se ha descrito anteriormente.

Las muestras enfriadas se descongelaron y se inyectaron en un sistema UPLC-HDX de fase inversa enfriado (0°C) (Waters Inc., EE.UU.) equipado con una columna de pepsina de empaquetado casero (volumen interno de 60µl, perlas de pepsina adquiridas a Thermo Scientific Inc.). Aquí, las muestras de proteína deuterada se sometieron a digestión de pepsina en línea a 20°C, y los péptidos pépticos resultantes se separaron por UPLC de fase inversa. Se ionizaron los péptidos mediante ionización por electropulverización en un espectrómetro de masas (espectrómetro de masas Synapt G2, Waters Inc, R.U.), en el que se separaron los péptidos adicionalmente mediante movilidad iónica antes de la determinación de masas final.

La identificación de los péptidos se realizó en muestras totalmente reducidas y no deuteradas mediante espectrometría de masas en tándem utilizando una combinación de adquisición independiente de los datos (MSe) y dependiente de los datos.

Análisis de los datos

Identificación de péptidos

Los espectros de masas adquiridos se corrigieron con la masa de la GFP y se analizaron en PLGS 3.0, que comparó los iones precursores y fragmentarios con una base de datos local de proteínas. Se evaluaron manualmente con cuidado todas las identificaciones de péptidos.

Determinación de la incorporación de deuterio: Se corrigieron con masa bloqueada frente a GFP los espectros de masas adquiridos y se usó el software DynamX 3.0 (Waters Inc., EE.UU.) para determinar la incorporación de deuterio para todos los péptidos de sortilina o bien en ausencia o bien en presencia de anticuerpos.

Se consideró que un péptido formaba parte del epítipo de unión si se observaba una protección contra el intercambio superior a 0.5D en presencia de un anticuerpo.

Tabla 1 - Tabla de epítomos conformacionales identificados mediante HDX-MS.

Anticuerpo	Mapeo de epítomos mediante HDX-MS con relación a SEQ ID NO:169				
45	109-114	126-153		570-572	588-597
68	109-114	126-144	154-159	570-572	593-597
811-02	109-114	126-144			593-597

Ejemplo 17: Microdiálisis para evaluar los niveles de progranulina en el cerebro de animales despiertos que se mueven libremente

Se utilizó el método de microdiálisis push-pull para evaluar la progranulina (PRGN) del ISF cerebral de ratones despiertos y en movimiento libre. Se alojaron individualmente los ratones en condiciones controladas de temperatura (22 ± 1.5 °C) y humedad (55-65%) y se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas (la luz se enciende a las 06:00 h). El alimento y el agua estaban disponibles a voluntad. Se realizó el estudio actual en el hipocampo de ratones con activación génica de sortilina humana (hSORT1) (22 semanas de edad). Para permitir la microdiálisis en el hipocampo, se anestesiaron los ratones con isoflurano y se implantó estereotóxicamente una cánula de guía intracerebral (CMA) en el cerebro, colocando la sonda de microdiálisis en el hipocampo (coordenadas de la punta de la sonda: 3.1 mm posterior y 2.8 mm lateral del bregma, y 1.3 mm con respecto a la duramadre), según el atlas de Paxinos y Franklin 2001. Se usó cemento acrílico para la fijación de las cánulas de guía. Después de la implantación de la cánula, se dejó que los ratones se recuperaran de la cirugía durante 7 días antes de la diálisis. Durante los primeros 5 días, incluyendo el día de la cirugía, los animales tuvieron dolor y recibieron tratamientos con antibióticos (Rimadyl y Noromox Prolongatum). 24 h antes del inicio de los experimentos de microdiálisis, también se conectó la bomba peristáltica al tubo de salida para impedir la pérdida de líquido de perfusión de la sonda, introduciendo el fluido a lo largo del tubo. Como tampón de perfusión, se diluyó al 0.2 % albúmina bovina fracción V (Sigma) al 25 % con LCR artificial (aCSF; en mM: 147 NaCl, 2,7 KCl, 1,2 CaCl₂, 0,85 MgCl₂) el día de su utilización y filtrada a través de una membrana de 0.1 µm. Se determinó la velocidad de flujo real de la bomba sin tener conectada la sonda. Se pesaron los tubos de muestra antes y después del muestreo durante un periodo de tiempo dado y se calculó la velocidad de flujo. La bomba se ajustó para tener un flujo constante de 1 µl/min. Se usó un régimen de muestreo de 120 min a lo largo de todo el periodo del experimento y se recogieron 12 muestras (12 h de recogida) (**figura 17**, para el procedimiento). Al final de los experimentos, se extrajo sangre de los animales, se perfundieron los animales y se recogieron los cerebros. Se almacenaron los dializados, plasma y cerebros a -80°C hasta la determinación de PRGN mediante ELISA.

La medición de los niveles de PRGN cada 2h durante 24h se representa en la **Figura 17**. En todos los periodos de tiempo, excepto 24h después de iniciar la recogida de los dializados, los niveles de PRGN aumentan significativamente en los animales tratados con mab #45 en comparación con los de los animales tratados con PBS (**Figura 18a**). Los niveles de PRGN son estables a lo largo del tiempo desde 4 h hasta 16 h después de la inserción de la sonda en el hipocampo. En el primer dializado PRGN está elevada probablemente debido a la inserción de la sonda en el hipocampo. Se especula que los niveles de PRGN disminuyen ≥ 18 h/20 h después de la inserción de la sonda, probablemente debido a la obstrucción de la membrana de la sonda, ya que se produjo en ambos grupos (y se ha observado previamente en otros estudios de infusión-succión).

La media \pm SEM de las 12 muestras de diálisis 24h después del tratamiento con anticuerpos o vehículo, para cada animal y luego todos los animales agrupados, se tomó como línea de base (**Figura 18b**). Se analizaron las diferencias entre animales tratados con AcM n.º 45 y PBS con la prueba de la t para datos independientes. Los niveles basales de PRGN en los animales tratados con mab n.º 45 aumentaron significativamente en comparación con los de los animales tratados con PBS ($p < 0.001$, F10.0, DFn, 9 Dfd 7; 3.3 ± 0.3 ng/ml, n= 10 frente a 1.1 ± 0.1 ng/ml, n= 8) (**Figura 18b**).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse específicamente a Sortilina e inhibir o reducir la unión de PGRN a Sortilina, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a la Región D de Sortilina como se define por la **SEQ ID NO:170**, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo (3)-(21):

El anticuerpo (3) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:17**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:18**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:19**;
- 10 d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:20**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:21**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:22**.

El anticuerpo (4) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:25**;
- 15 b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:26**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:27**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:28**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:29**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:30**.

20 El anticuerpo (5) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:33**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:34**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:35**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:36**;
- 25 e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:37**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:38**.

El anticuerpo (6) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:41**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:42**;
- 30 c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:43**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:44**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:45**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:46**.

El anticuerpo (7) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- 35 a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:49**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:50**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:51**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:52**;

- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:53**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:54**.

El anticuerpo (8) i o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:57**;
- 5 b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:58**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:59**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:60**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:61**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:62**.

10 El anticuerpo (9) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:65**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:66**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:67**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:68**;
- 15 e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:69**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:70**.

El anticuerpo (10) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:73**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:74**;
- 20 c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:75**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:76**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:77**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:78**.

El anticuerpo (11) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- 25 a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:81**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:82**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:83**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:84**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:85**; y
- 30 f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:86**.

El anticuerpo (12) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:89**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:90**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:91**;
- 35 d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:92**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:93**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:94**.

El anticuerpo (13) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:97**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:98**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:99**;
- 5 d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:100**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:101**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:102**.

El anticuerpo (14) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:105**;
- 10 b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:106**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:107**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:108**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:109**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:110**.

15 El anticuerpo (15) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:113**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:114**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:115**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:116**;
- 20 e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:117**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:118**.

El anticuerpo (16) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:121**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:122**;
- 25 c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:123**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:124**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:125**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:126**.

El anticuerpo (17) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- 30 a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:129**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:130**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:131**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:132**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:133**; y
- 35 f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:134**.

El anticuerpo (18) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:137**;

- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:138**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:139**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:140**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:141**; y
- 5 f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:142**.

El anticuerpo (19) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:145**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:146**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:147**;
- 10 d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:148**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:149**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:150**.

El anticuerpo (20) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:153**;
- 15 b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:154**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:155**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:156**;
- e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:157**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:158**.

20 El anticuerpo (21) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

- a. un dominio variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende la **SEQ ID NO:161**;
- b. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:162**;
- c. un dominio variable de cadena ligera L-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:163**;
- d. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 1 que comprende la **SEQ ID NO:164**;
- 25 e. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende la **SEQ ID NO:165**; y
- f. un dominio variable de cadena pesada H-CDR 3 que comprende la **SEQ ID NO:166**.

2. Un anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que:

El anticuerpo (3) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:24** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:23**.

30 El anticuerpo (4) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:32** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:31**.

El anticuerpo (5) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:40** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:39**.

35 El anticuerpo (6) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:48** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:47**.

El anticuerpo (7) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:56** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:55**.

El anticuerpo (8) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:64** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:63**.

- El anticuerpo (9) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:72** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:71**.
- El anticuerpo (10) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:80** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:79**.
- 5 El anticuerpo (11) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:88** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:87**.
- El anticuerpo (12) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:96** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:95**.
- 10 El anticuerpo (13) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:104** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:103**.
- El anticuerpo (14) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:112** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:111**.
- El anticuerpo (15) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:120** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:119**.
- 15 El anticuerpo (16) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:128** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:127**.
- El anticuerpo (17) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:136** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:135**.
- 20 El anticuerpo (18) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:144** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:143**.
- El anticuerpo (19) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:152** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:151**.
- El anticuerpo (20) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:160** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:159**.
- 25 El anticuerpo (21) o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la **SEQ ID NO:168** y un dominio variable de cadena ligera que comprende la **SEQ ID NO:167**.
3. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según las reivindicaciones 1-2, en el que el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento Fv (por ejemplo, Fv de cadena simple o un Fv unido por disulfuro); un fragmento tipo Fab (por ejemplo, fragmento Fab, fragmento Fab' o fragmento F(ab)2); y un anticuerpo de dominio (por ejemplo, un dominio variable VH simple o dominio variable VL).
- 30 4. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo consiste en un anticuerpo intacto.
5. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 35 6. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano, humanizado, recombinante o quimérico.
7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 8. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se define en cualquiera de las reivindicaciones la 1 a la 6, o la composición farmacéutica de la reivindicación 7, para su uso en medicina.
9. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se define en cualquiera de las reivindicaciones la 1 a la 6, o la composición farmacéutica de la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de la demencia frontotemporal (DFT), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o la enfermedad de Alzheimer (AD).
- 45

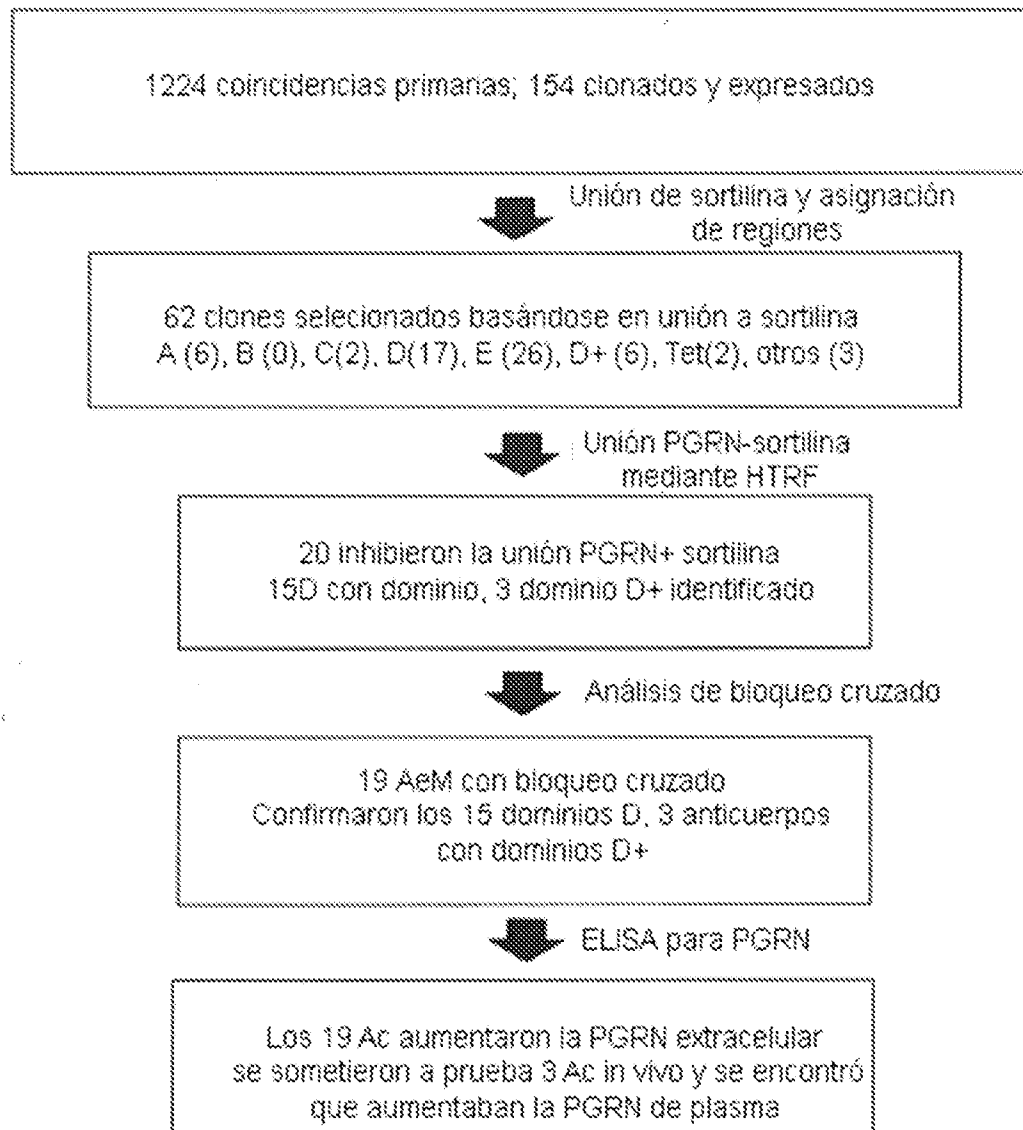


Fig 1

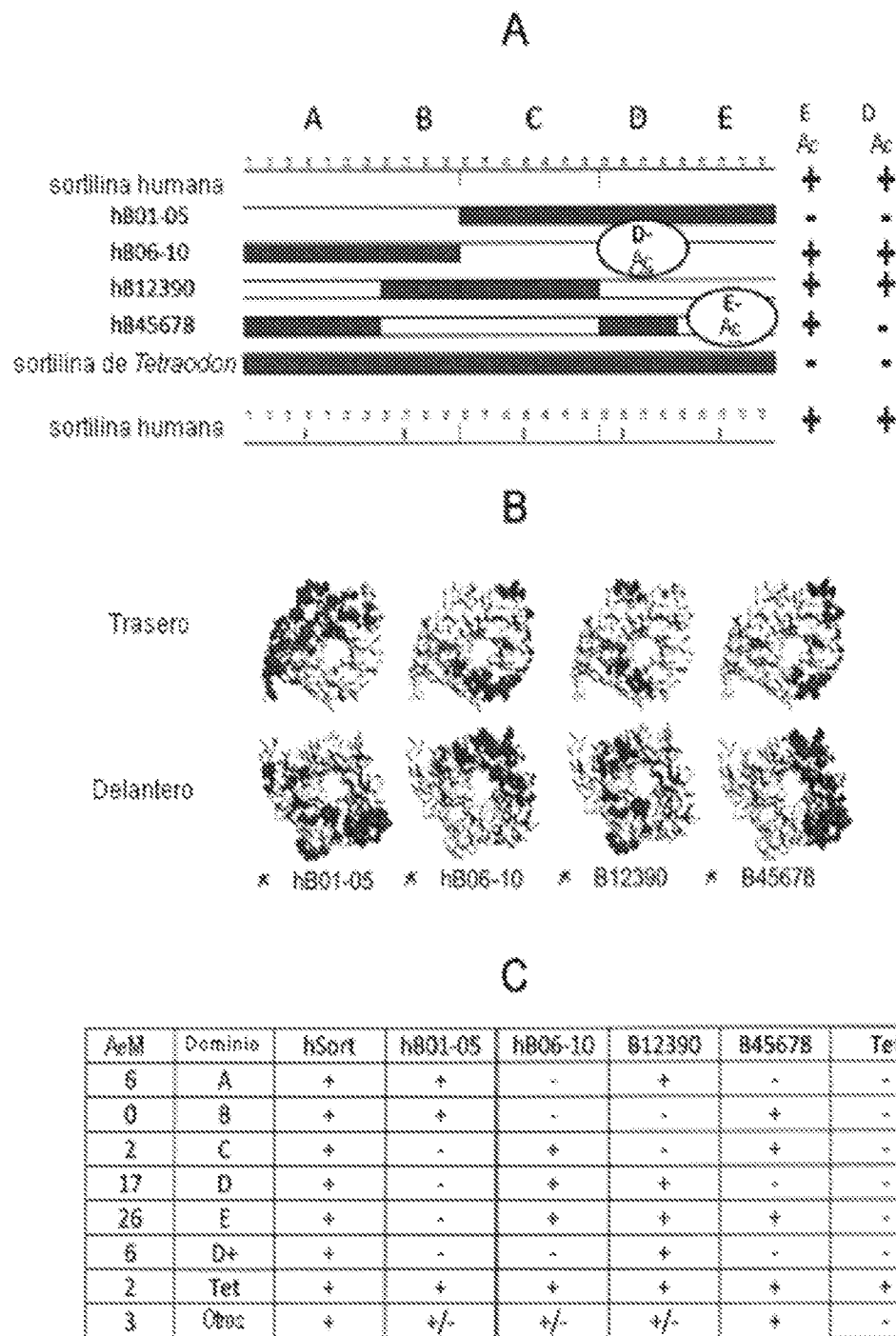


Fig 2

AeM	Dominio	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tet
002	D	2,40	NB	43,30	2,44	NB	NB
044	D	1,38	NB	21,20	1,03	NB	NB
045	D	1,56	NB	9,60	1,10	NB	NB
68	D+	1,80	NB	NB	1,87	NB	NB
088	D	2,49	NB	9,55	1,57	NB	NB
093-01	D	3,47	NB	44,53	2,13	NB	NB
093-05	D	2,88	NB	43,24	1,78	NB	NB
193	D	2,07	NB	5,57	0,83	NB	NB
531	D+	5,50	NB	NB	2,29	NB	NB
548	D+	4,49	NB	NB	3,36	NB	NB
562	D	2,23	NB	24,56	1,34	NB	NB
566	D	2,93	NB	42,55	2,12	NB	NB
811	D	1,81	NB	0,00	1,00	ND	ND
849	D	1,01	NB	17,08	0,78	NB	NB
924	D	6,76	NB	20,01	3,83	NB	NB
1276	D	2,24	NB	8,78	0,93	NB	NB
1289	D	1,62	NB	15,23	0,96	NB	NB
1320	D	19,14	NB	55,43	12,32	NB	NB

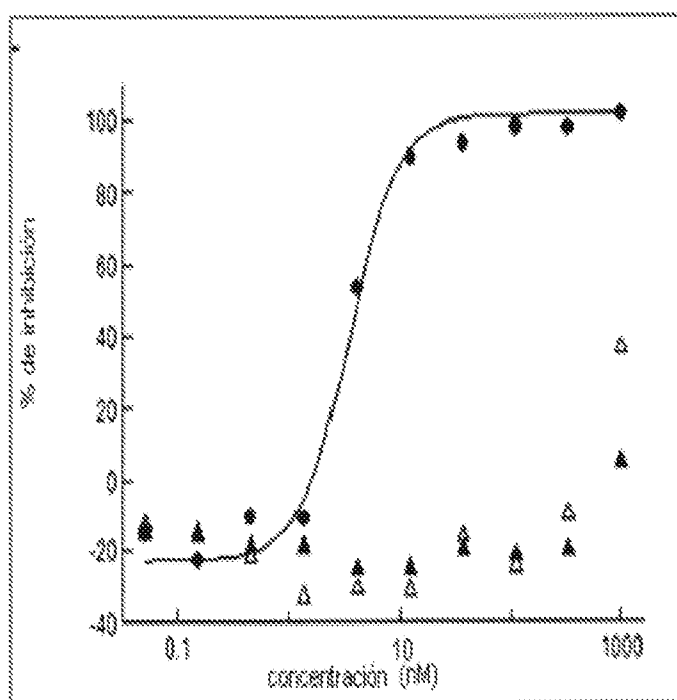
+	EC50 0.1-10 ng/ml
+	EC50 >10 ng/ml
NB	sin unión

Fig 3

AeM	Dominio	hSort	hB01-05	hB06-10	B12390	B45678	Tet
1F2F4	D	1,56	NB	9,60	1,10	NB	NB
5E1F6	D	1,14	NB	0,72	0,59	NB	NB

÷	unión
NB	sin unión

Fig 4



Anticuerpo	CI50 (nM)
IgG1-6003-045	3.5 ± 0.6
Anticuerpo de dominio E	>1000 *
IgG1-B12 (ctrl)	>1000 **

* anticuerpo demasiado débil para ajustar una curva de dosis- respuesta. Inhibición del 6% a 1 μ M

** anticuerpo de control demasiado débil para ajustar una curva de dosis- respuesta. Inhibición del 37% a 1 μ M

Fig 5

Ac	mayor conc. (nM)	% in mayor conc.	CI50 (nM)	Dominio
IgG1-6003-002	500	91	4,3	D
IgG1-6003-044	1000	101	3,4	D
IgG1-6003-045	1000	102	3,9	D
IgG1-6003-068	1000	92	22	D+
IgG1-6003-088	1000	98	2,5	D
IgG1-6003-093-L01	1000	82	13	D
IgG1-6003-093-L05	1000	95	35	D
IgG1-6003-193	1000	93	1,8	D
IgG1-6003-531	1000	102	2,5	D+
IgG1-6003-548	600	87	11	D+
IgG1-6003-562	1000	100	5,8	D
IgG1-6003-568	1000	100	2,6	D
IgG1-6003-811	1000	102	4,4	D
IgG1-6003-849	1000	101	3,8	D
IgG1-6003-924	1000	100	3,3	D
IgG1-6003-1276	1000	108	2,5	D
IgG1-6003-1289	800	98	3,0	D
IgG1-6003-1320	900	75	32	D
IgG1-B12	1000	37	-	-

Fig 6

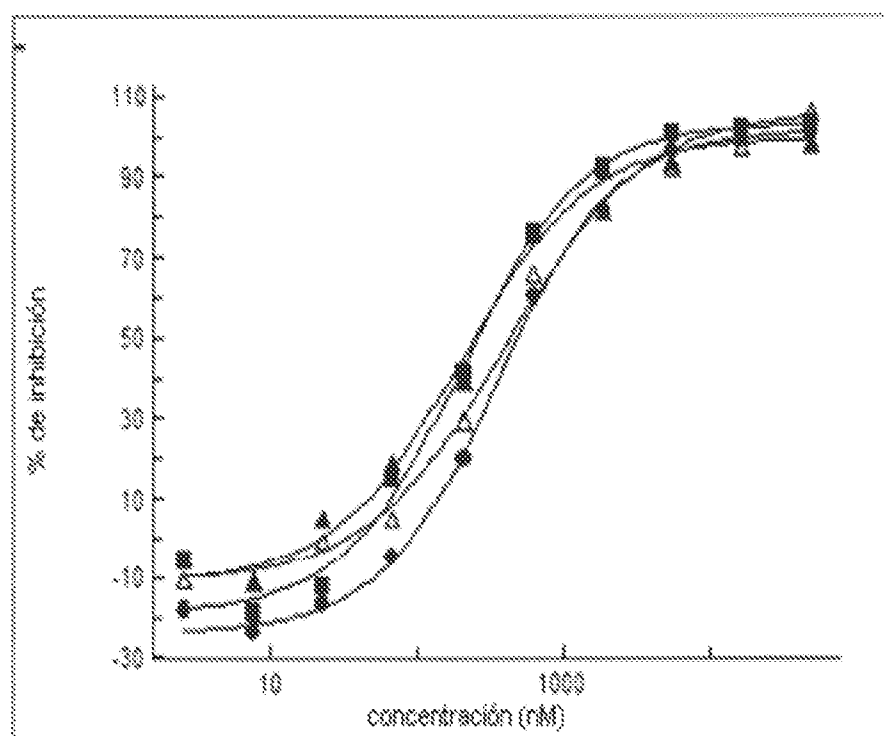
[illegible]

	1276	924	093- L01	093- L05	SE1F6	1F2F4	068	1320	A1
	D	D	D	D	D	D	D+	D	A
Domínio	articulo								
D+	548	0.02	0.04	0.01	0.02	x	0.03	0.04	0.07
D+	531	0.01	0.01	0.02	0.02	x	0.00	0.04	0.09
D	002	0.02	0.00	0.01	0.07	x	-0.02	0.02	0.57
D	044	0.01	0.00	0.03	0.02	x	-0.01	0.01	0.48
D	045	0.01	0.01	0.03	0.01	x	0.00	0.01	0.52
D	088	0.01	0.01	0.02	0.01	x	-0.02	0.03	0.77
D	193	0.03	0.03	0.02	0.03	x	0.01	0.04	0.42
D	562	0.00	0.00	0.01	0.01	x	-0.01	0.01	0.23
D	566	-0.03	0.01	0.00	-0.02	-0.01	-0.04	0.01	0.98
D	811	0.00	0.00	0.01	0.01	x	-0.02	0.01	0.77
D	1289	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	x	-0.02	0.00	0.45
D	848	-0.01	0.01	0.00	0.01	x	-0.01	0.01	0.73
D	1276	0.01	0.05	0.01	0.01	x	0.00	0.01	0.70
D	924	0.01	0.01	0.00	0.01	x	0.00	0.02	0.52
D	093-L01	0.00	0.01	0.01	0.02	x	-0.01	0.01	0.65
D	093-L05	0.01	0.02	0.01	0.02	x	-0.01	0.03	0.62
D	SE1F6	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.00	0.03	0.39
D	1F2F4	0.00	0.04	-0.01	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.41
D+	068	-0.01	0.01	0.02	0.01	x	-0.01	0.01	0.52
D	1320	-0.01	0.00	0.00	-0.01	0.00	-0.01	0.00	0.19

Fig 7 (cont)

	530	784	010	471	532	910	550	826	942
	E	E	E	E	E	E	Tetra	E	A
Domino	antieuropa	AcE1	AcE2	AcE3	AcE4	AcE5	AcE6	AcE7	AcA2
D+	548	0.01	0.03	0.22	0.26	0.27	0.22	0.06	0.01
D+	531	0.28	0.60	0.83	0.92	0.93	0.87	0.69	0.51
D	002	0.25	0.52	0.74	0.70	0.79	0.78	0.67	0.42
D	044	0.18	0.42	0.84	0.73	0.68	0.68	0.56	0.32
D	045	0.23	0.47	0.67	0.72	0.72	0.70	0.60	0.38
D	088	0.42	0.79	1.00	1.19	1.13	1.09	0.96	0.64
D	193	0.19	0.38	0.54	0.57	0.52	0.53	0.43	0.27
D	562	b	0.23	0.39	0.36	0.33	0.33	0.24	0.13
D	586	0.25	0.55	0.77	0.88	0.87	0.79	0.60	0.35
D	811	0.42	0.79	1.02	1.17	1.13	1.09	0.97	0.65
D	1289	0.18	0.43	0.56	0.67	0.63	0.64	0.47	0.29
D	849	0.37	0.74	0.96	1.11	1.06	1.04	0.90	0.58
D	1276	0.39	0.74	0.93	1.03	1.00	0.97	0.83	0.57
D	924	0.25	0.50	0.69	0.67	0.69	0.65	0.52	0.33
D	093-L01	0.31	0.64	0.82	0.93	0.92	0.87	0.78	0.49
D	093-L05	0.29	0.56	0.80	0.89	0.88	0.84	0.69	0.45
D	5E1F6	0.19	0.39	0.62	0.57	0.59	0.54	0.40	0.27
D	1F2F4	0.16	0.36	0.60	0.63	0.62	0.58	0.44	0.26
D+	068	0.26	0.58	0.80	0.94	0.94	0.89	0.80	0.43
D	1320	b	b	0.22	0.28	0.28	0.29	0.17	b

Fig 7 (cont)



sortilina + anticuerpo	CI50 AF38469 (nM)
Sortilina	371 ± 79
Sortilina + IgG1-6003-045	198 ± 32
Sortilina + IgG1-6003-068	199 ± 11
Sortilina + ctrl de isotipo de hIgG1	385 ± 113

Fig 8

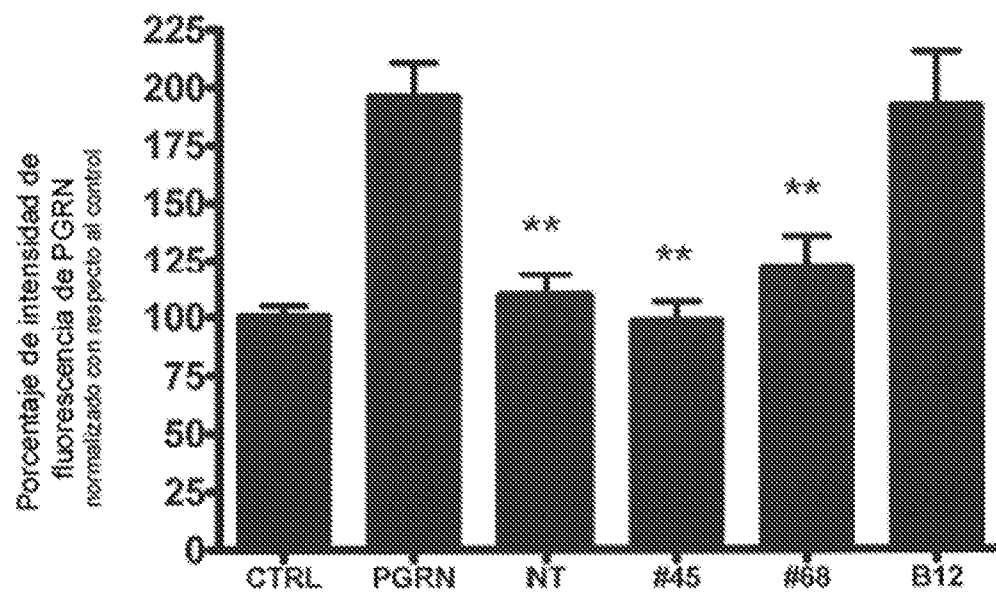


Fig 9

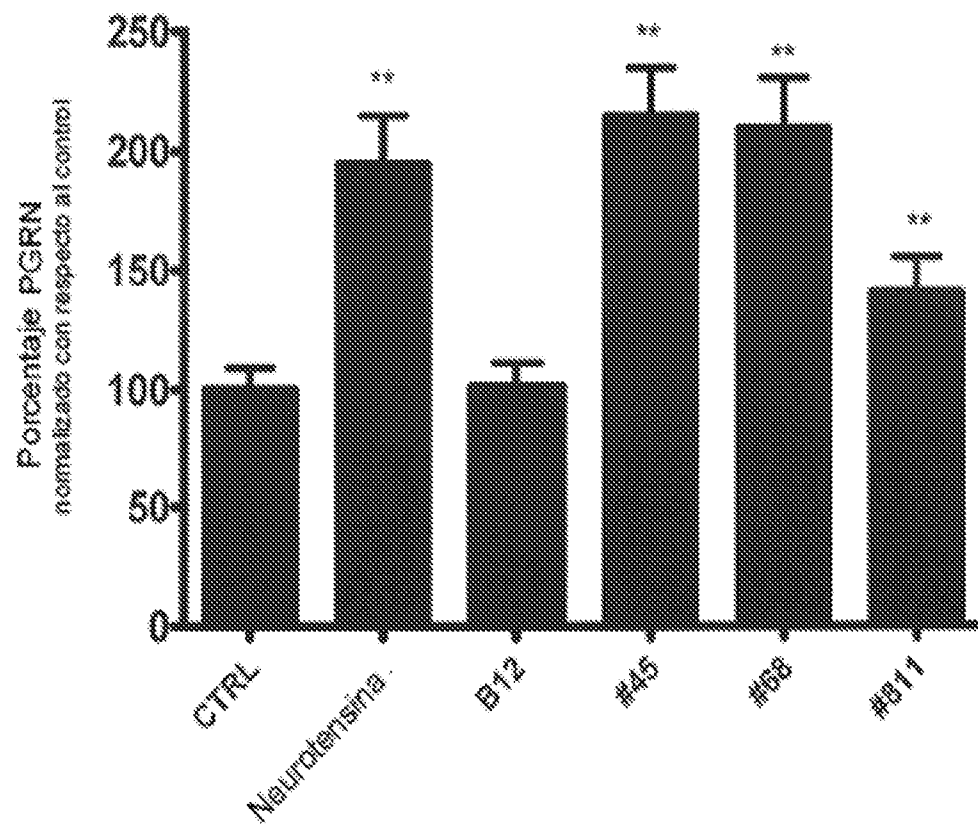


Fig 10

Ac No	PGRN %	Ac No	PGRN %
002	142	849	149
044	166	1276	163
045	202	924	125
088	121	093-L01	116
193	207	093-L05	140
562	139	1320	114
566	139	1F2F4	282
811	146	5E1F6	177
1289	117		
548	139	68	201
531	140		

Fig 11

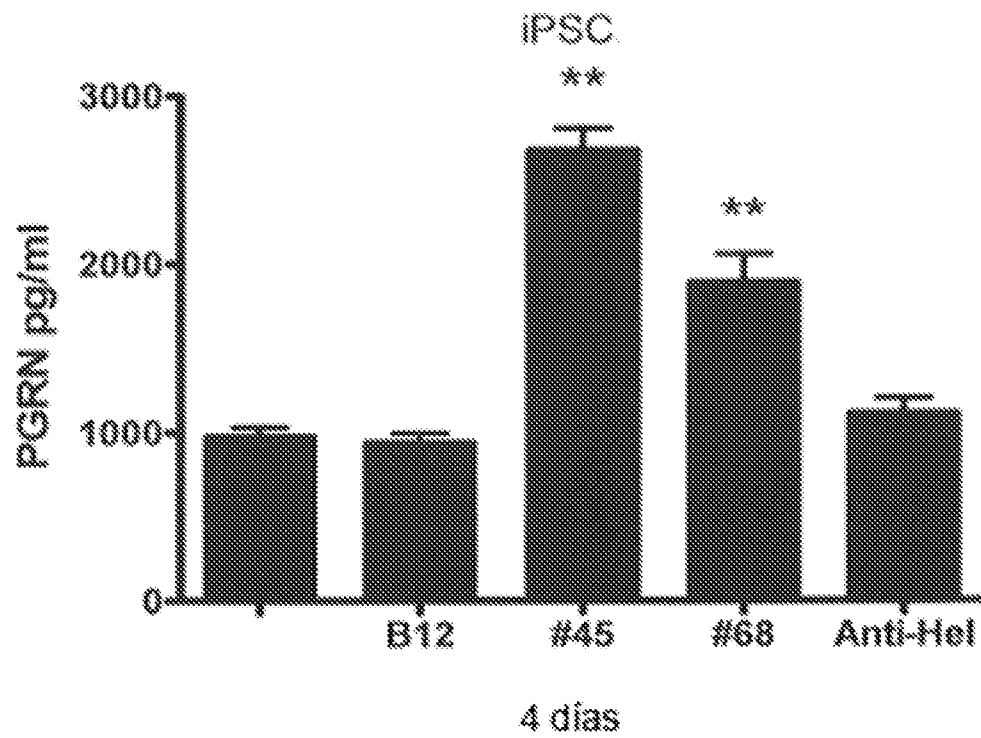
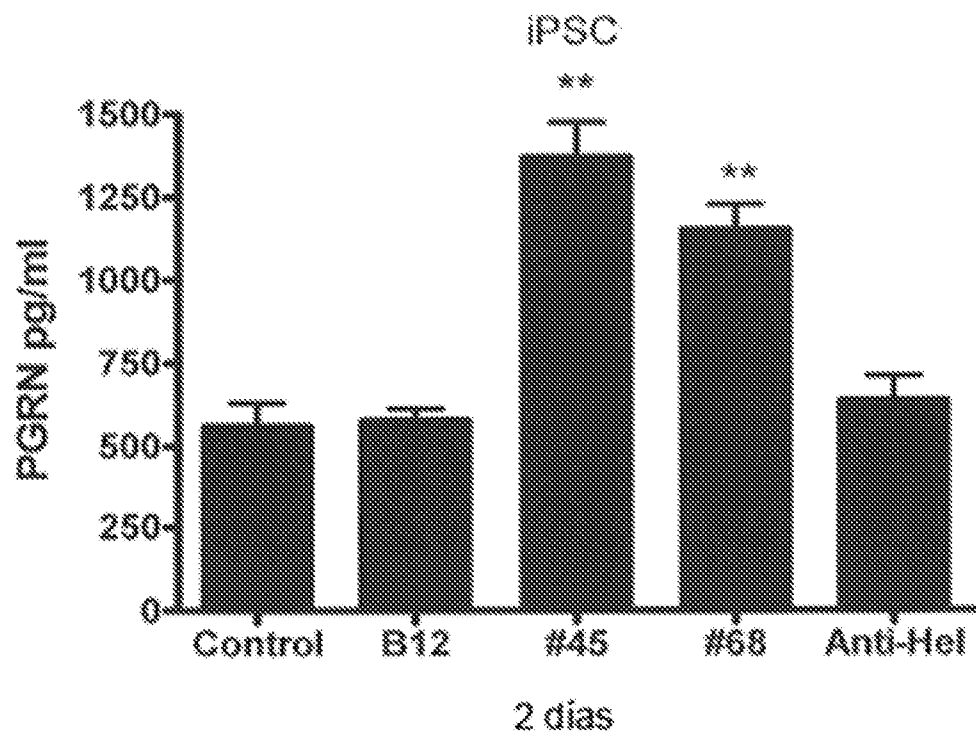


Fig 12

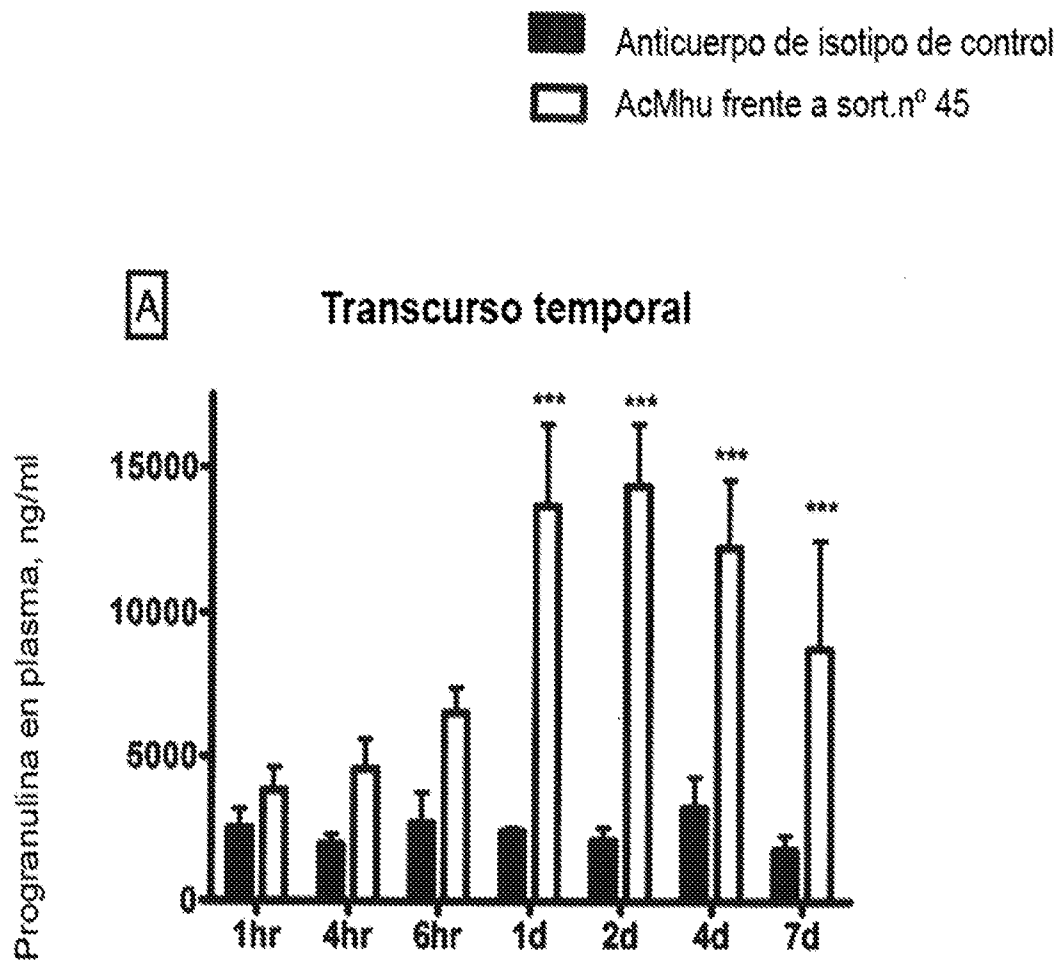


Fig 13 a

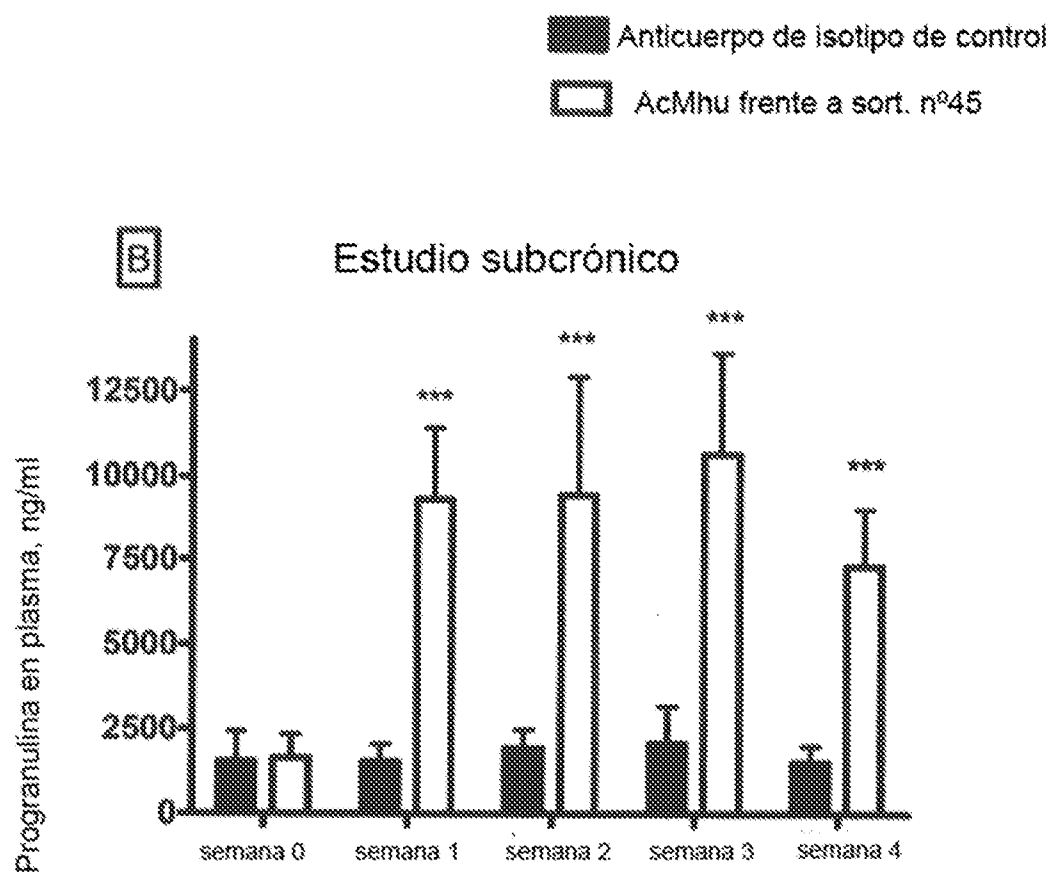


Fig 13 b

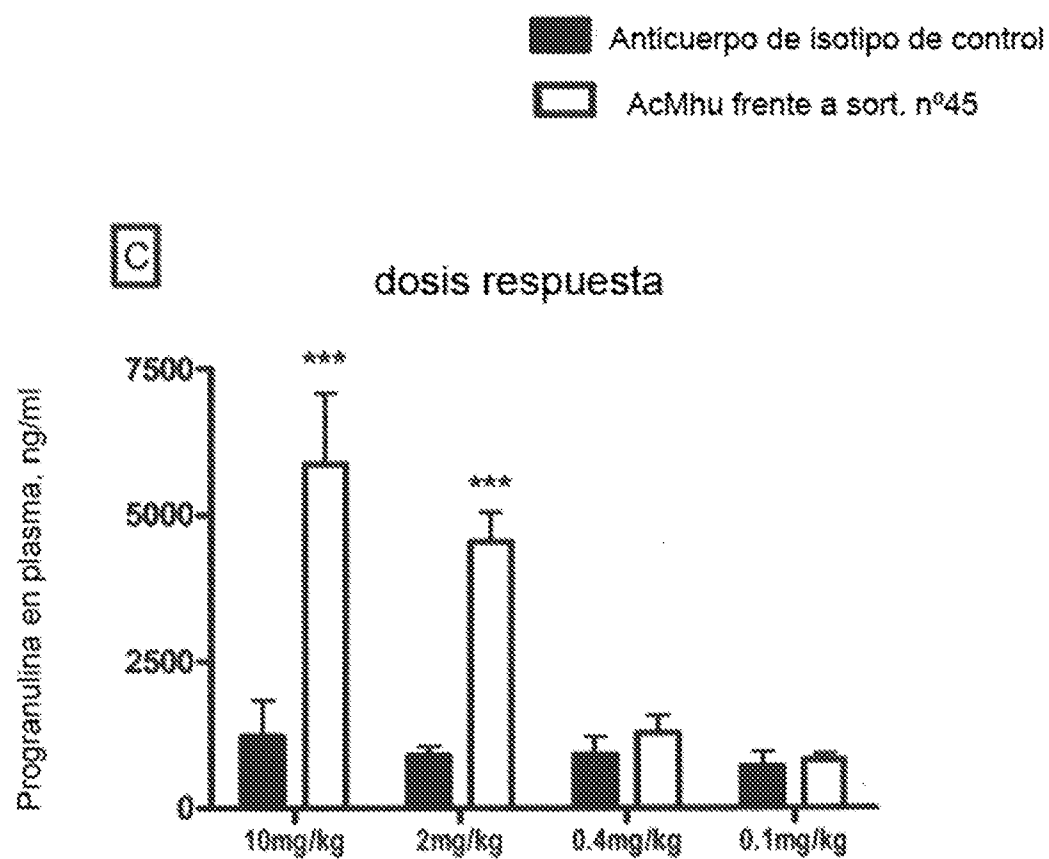


Fig 13 c

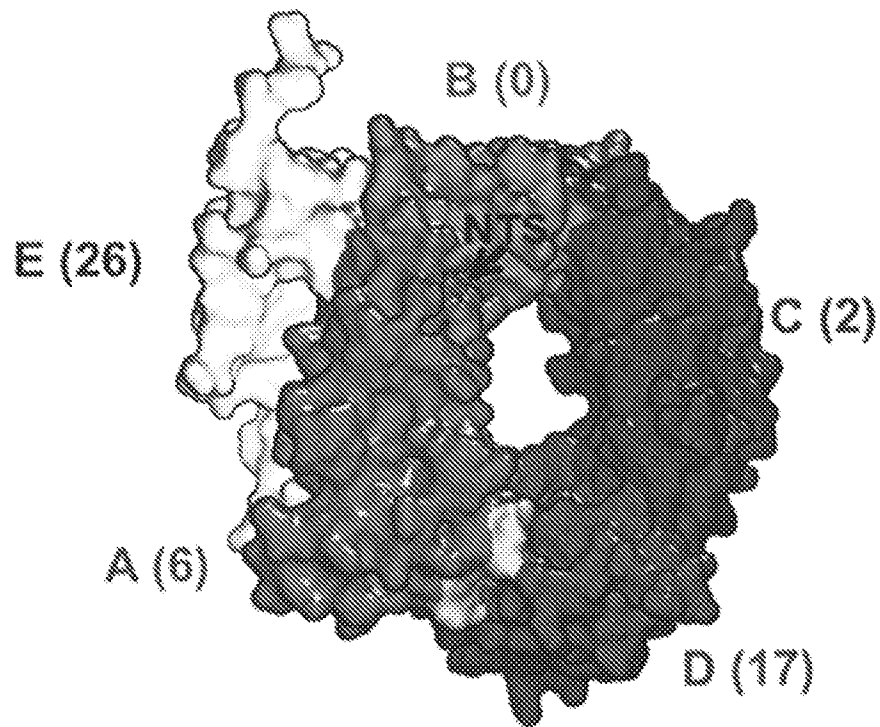


Fig 14

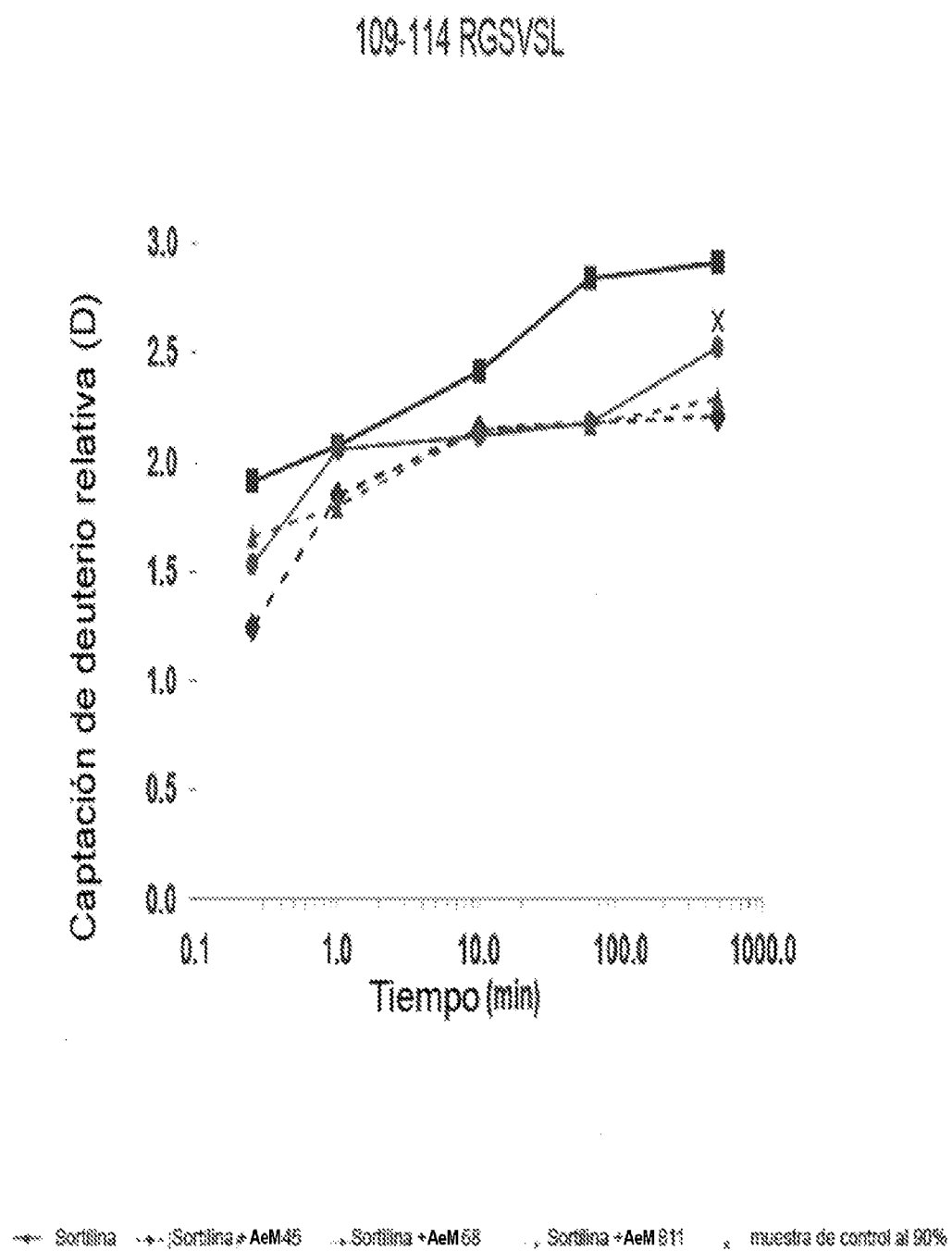


Fig 15 a (1)

115-125 SWVGDSTGVIL

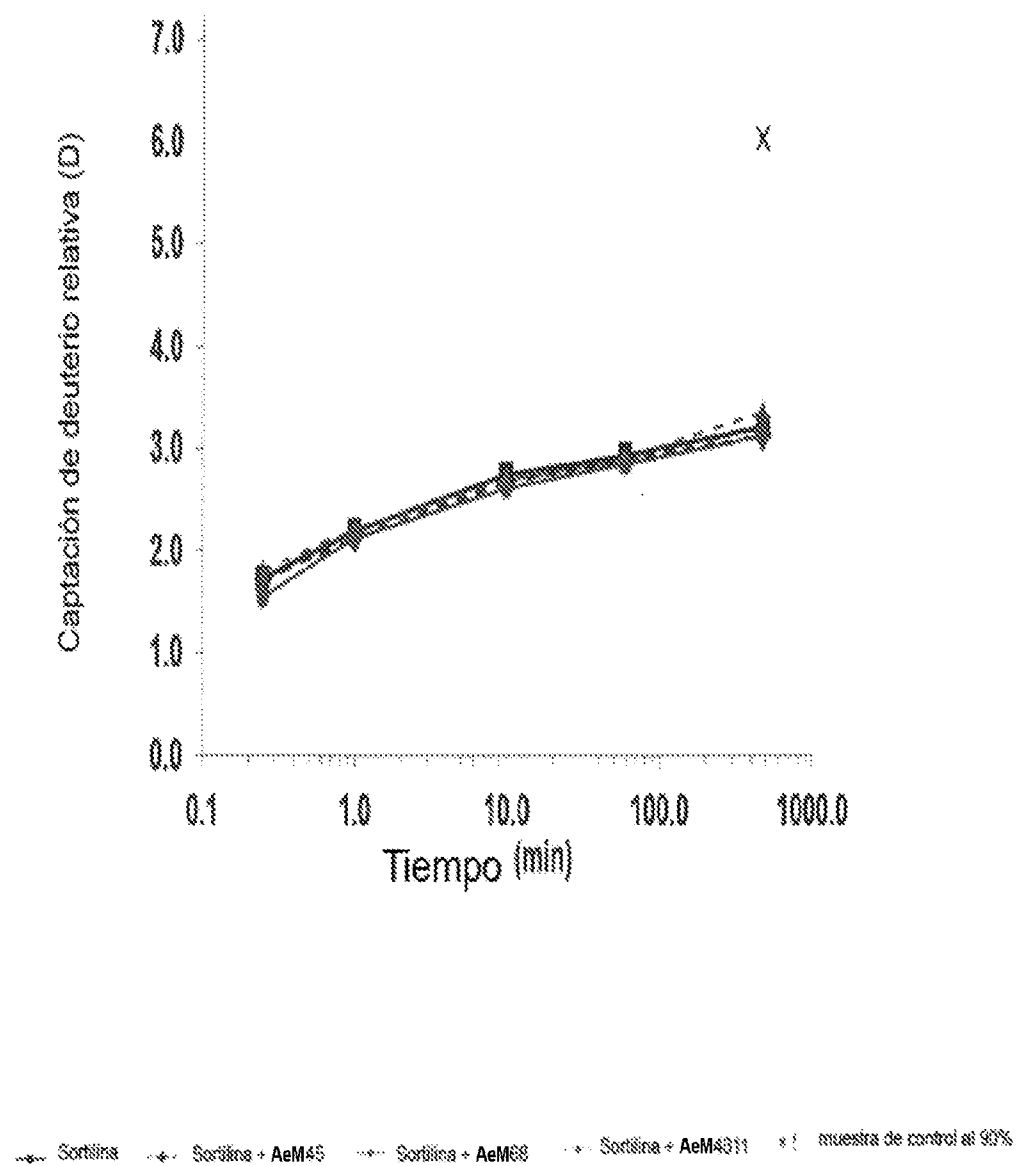


Fig 15 a (2)

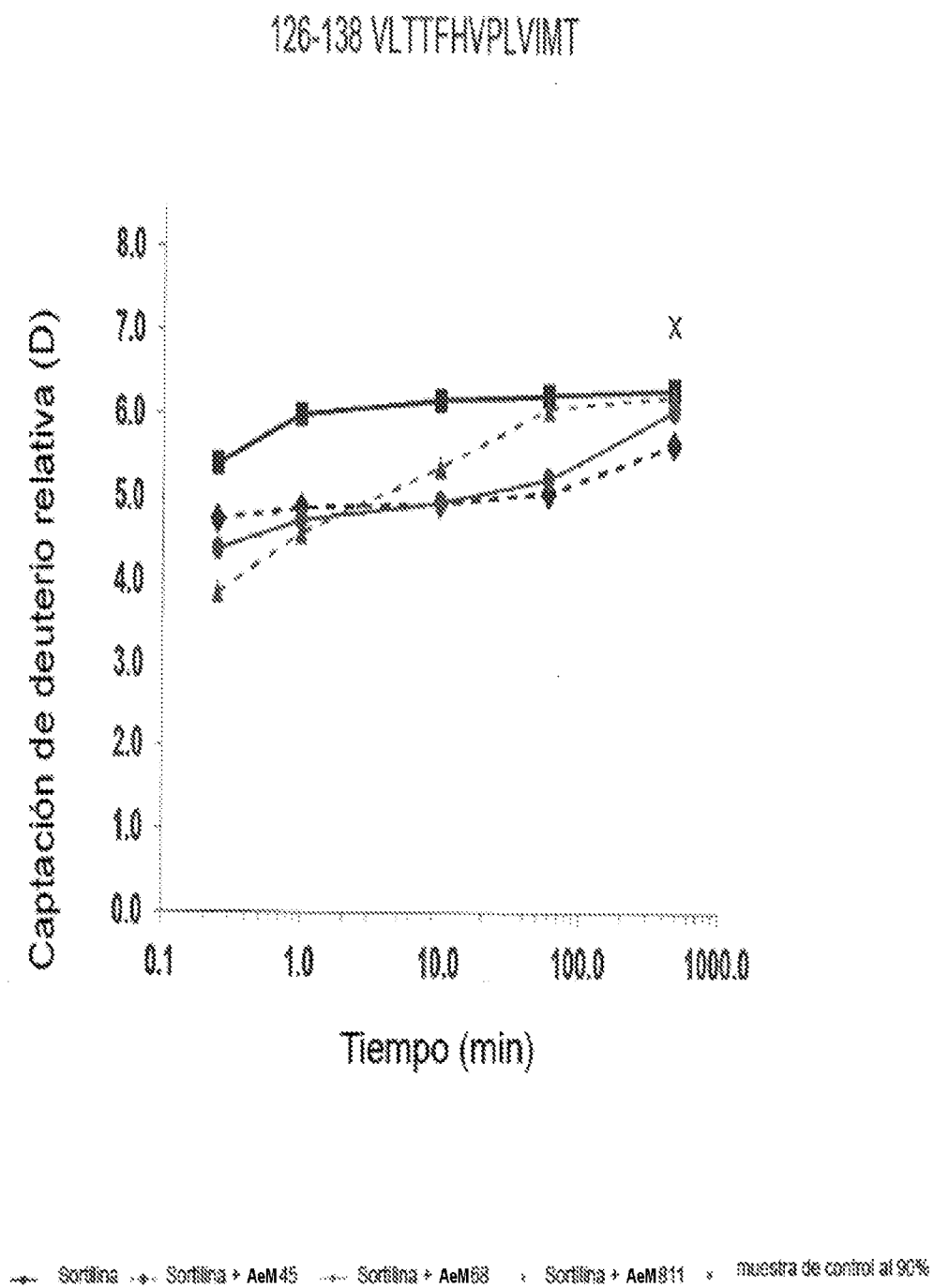


Fig 15 a (3)

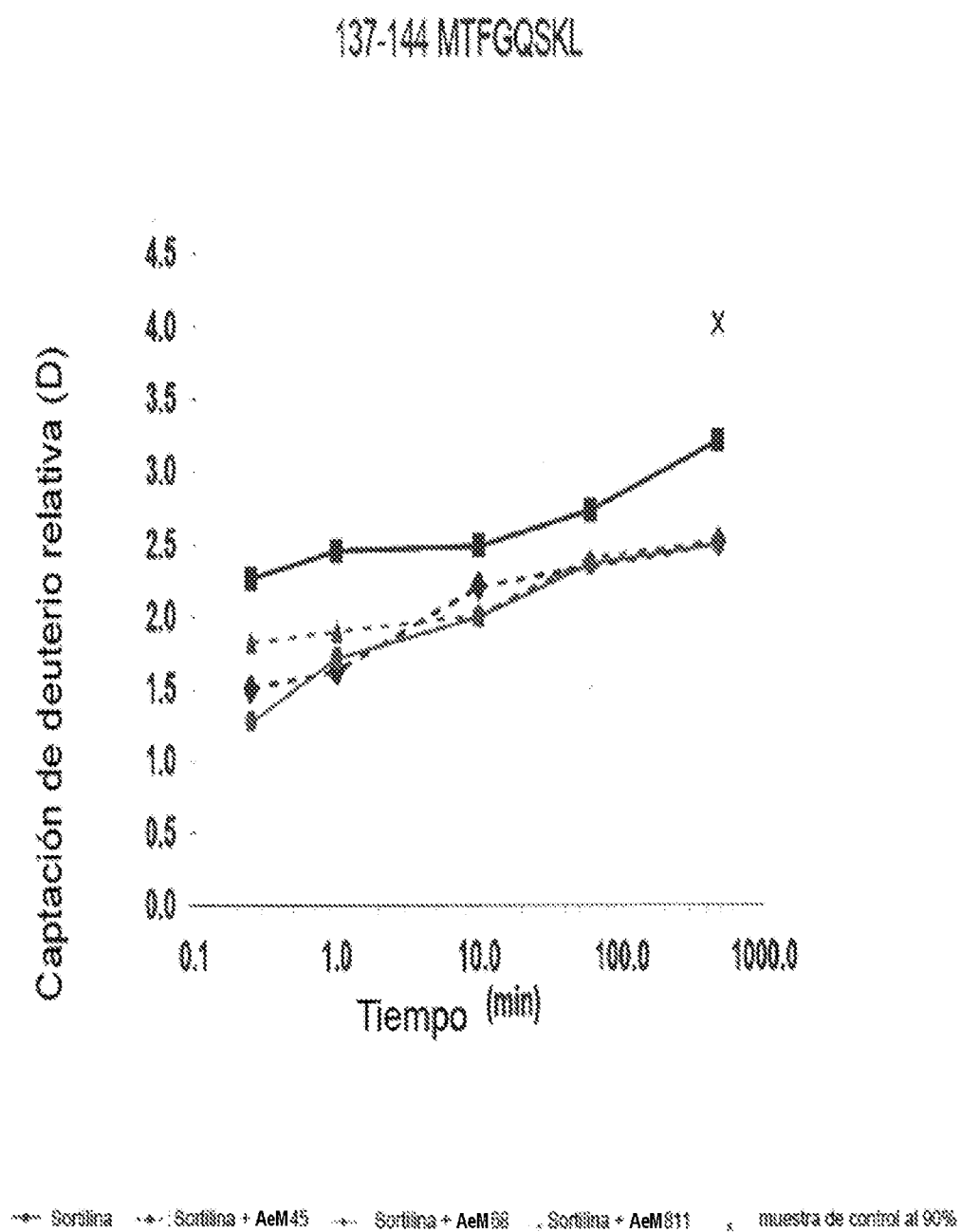


Fig 15 a (4)

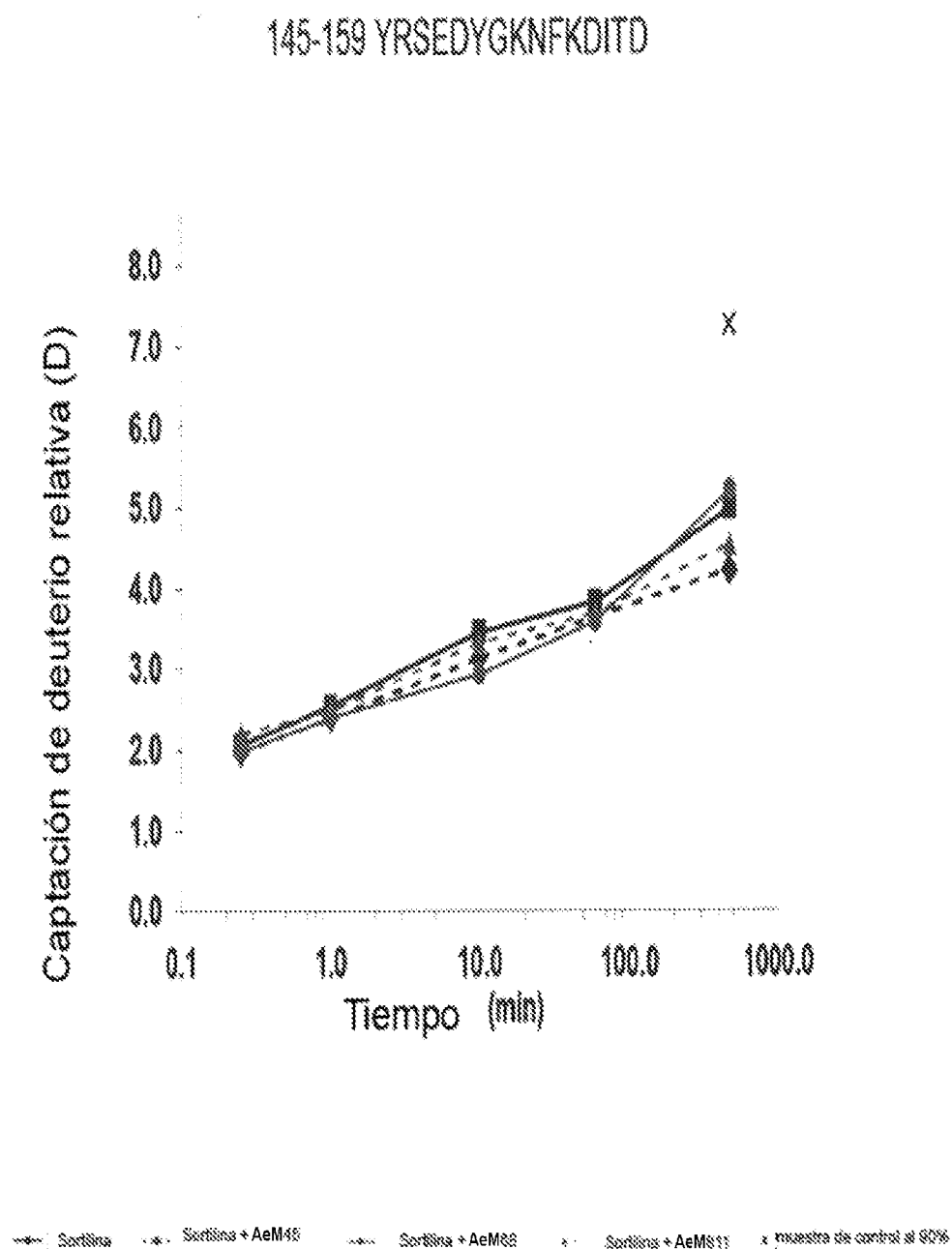


Fig 15 a (5)

154-159 FKDITD

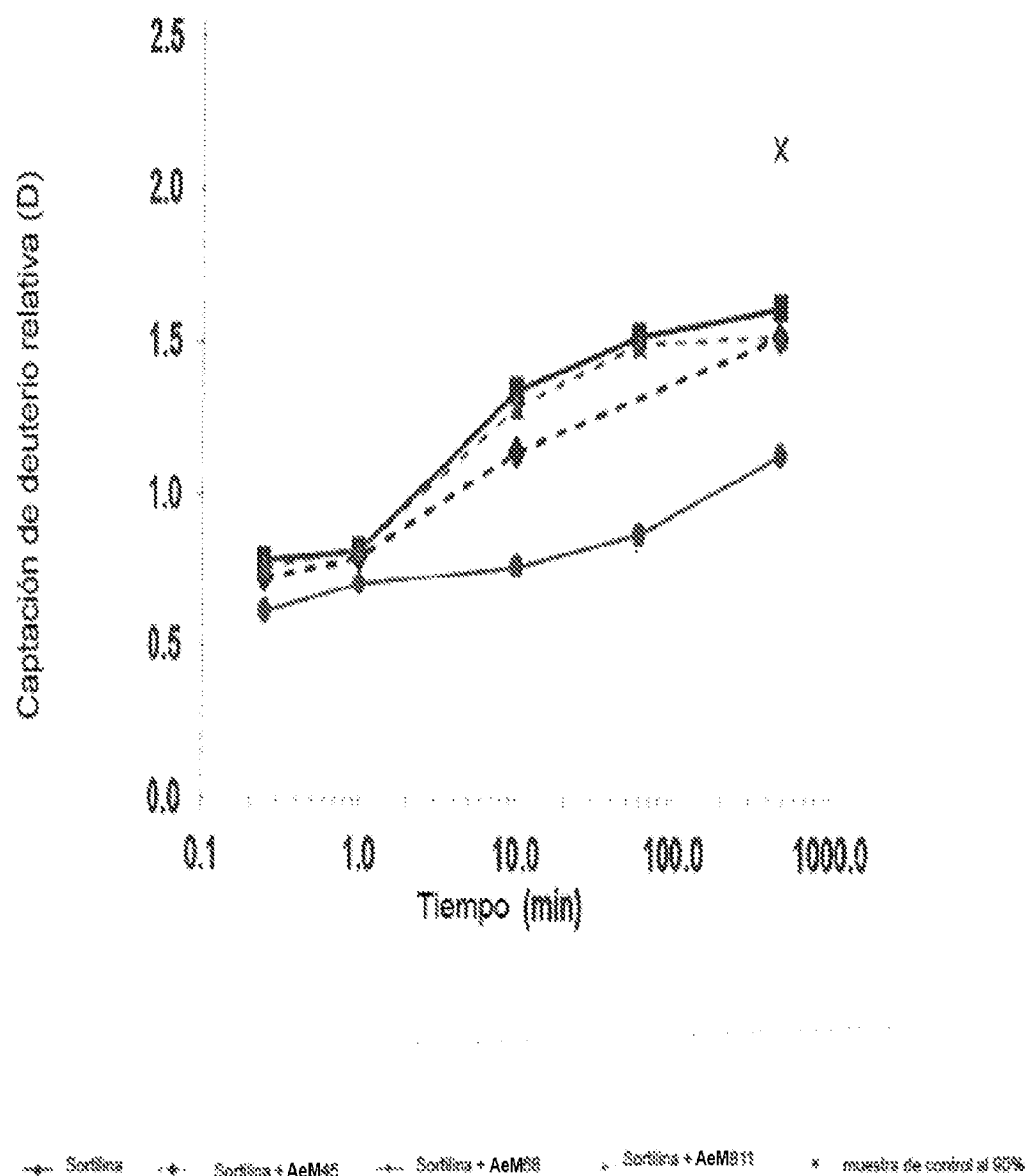


Fig 15 a (6)

562-572 FTRDPIYFTGL

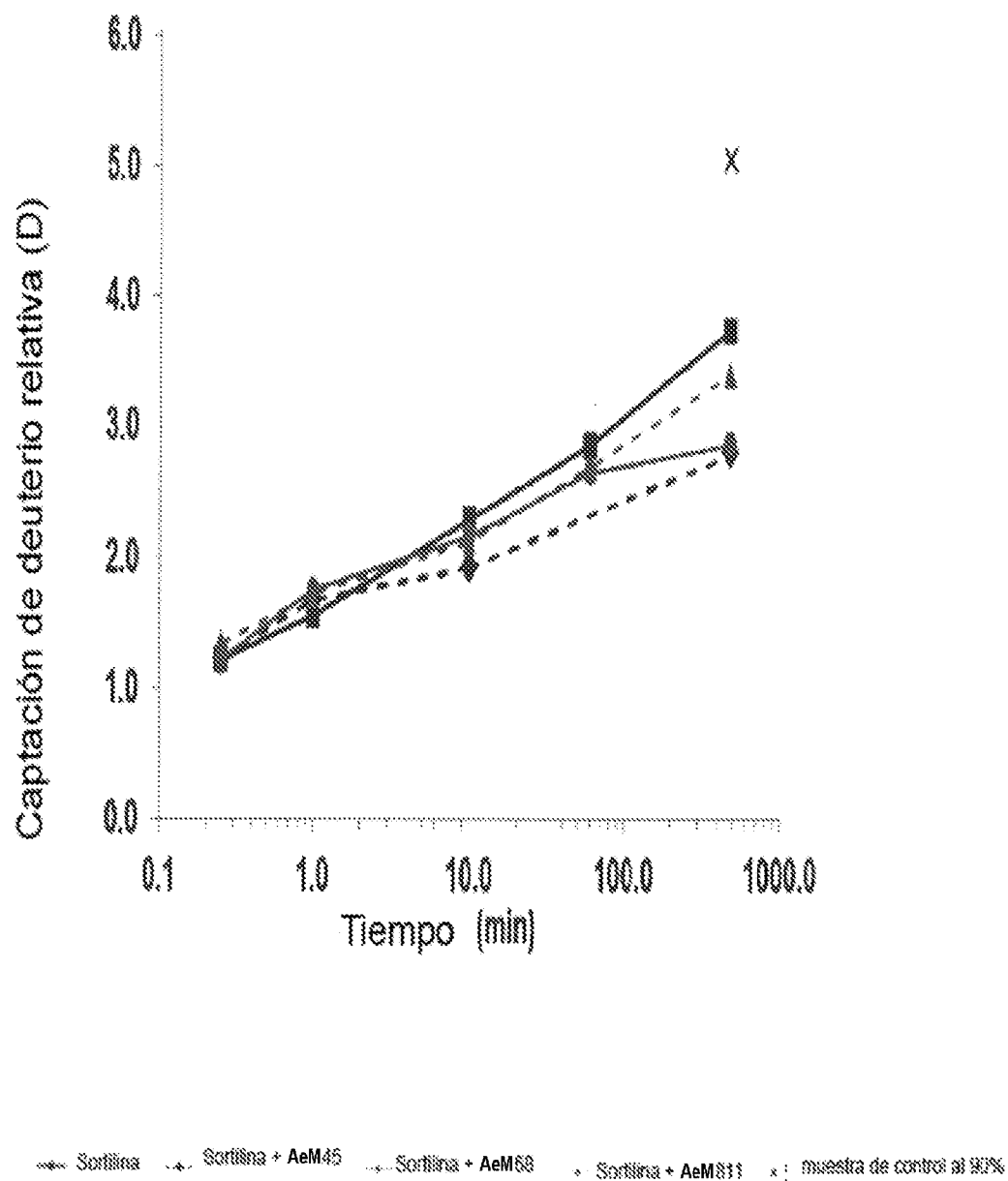


Fig 15 b (1)

588-592 FTESF

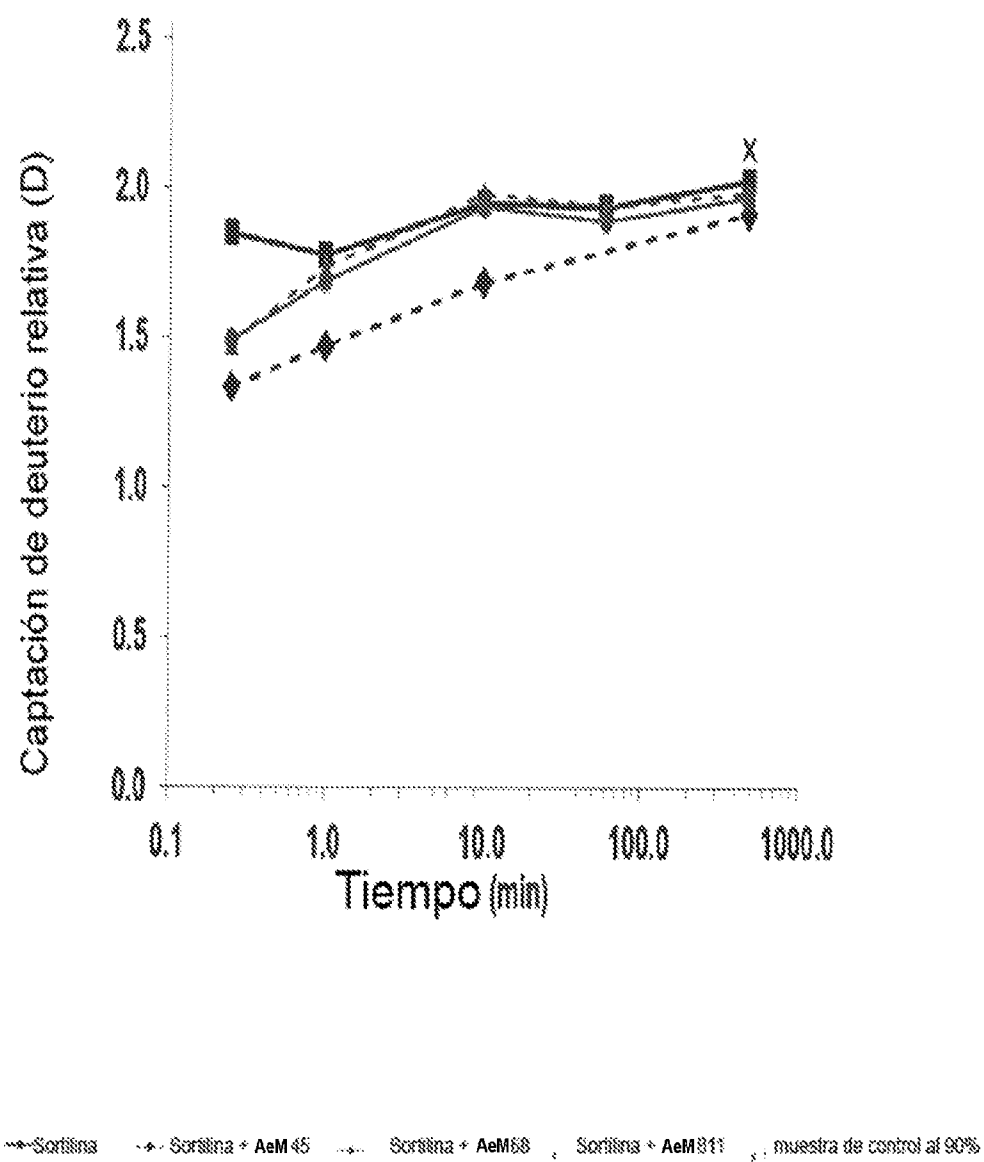


Fig 15 b (2)

593-597 LTSQW

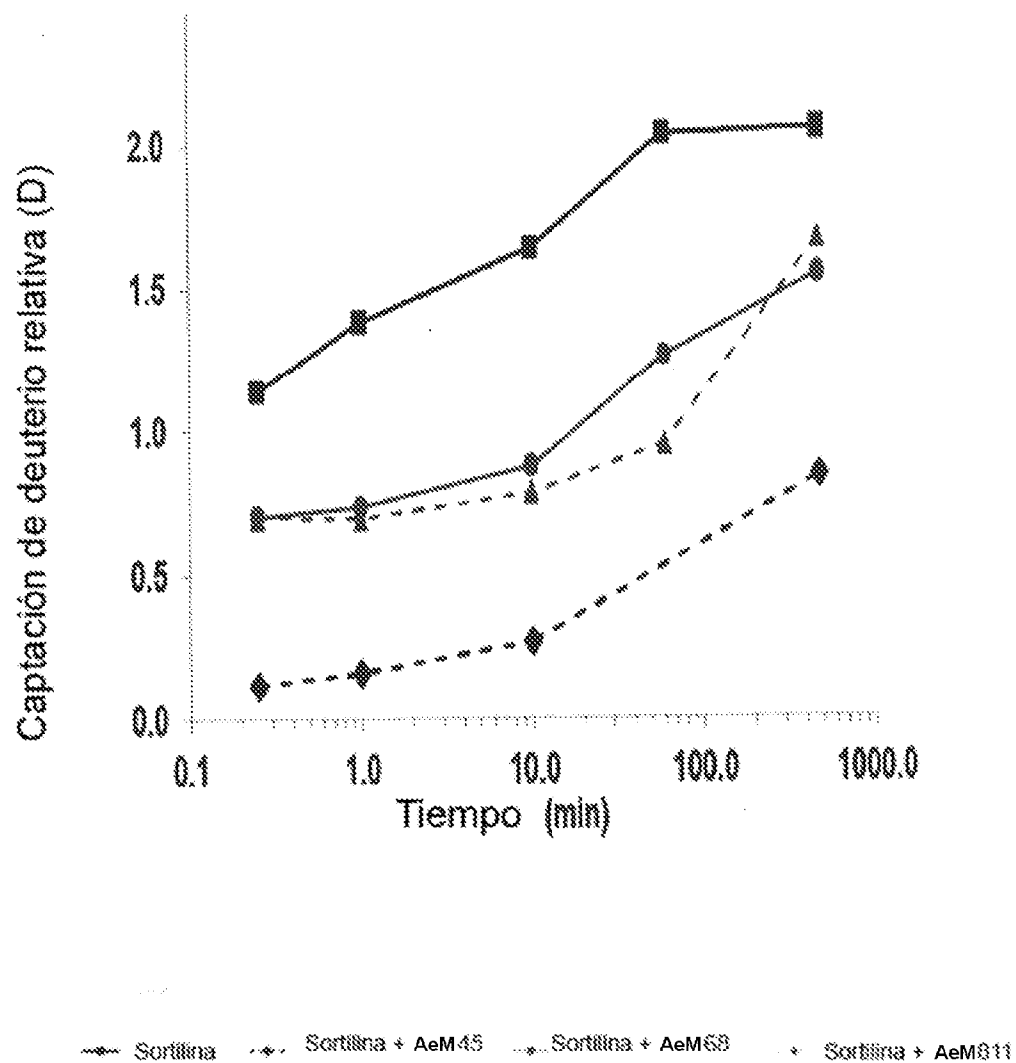


Fig 15 b (3)

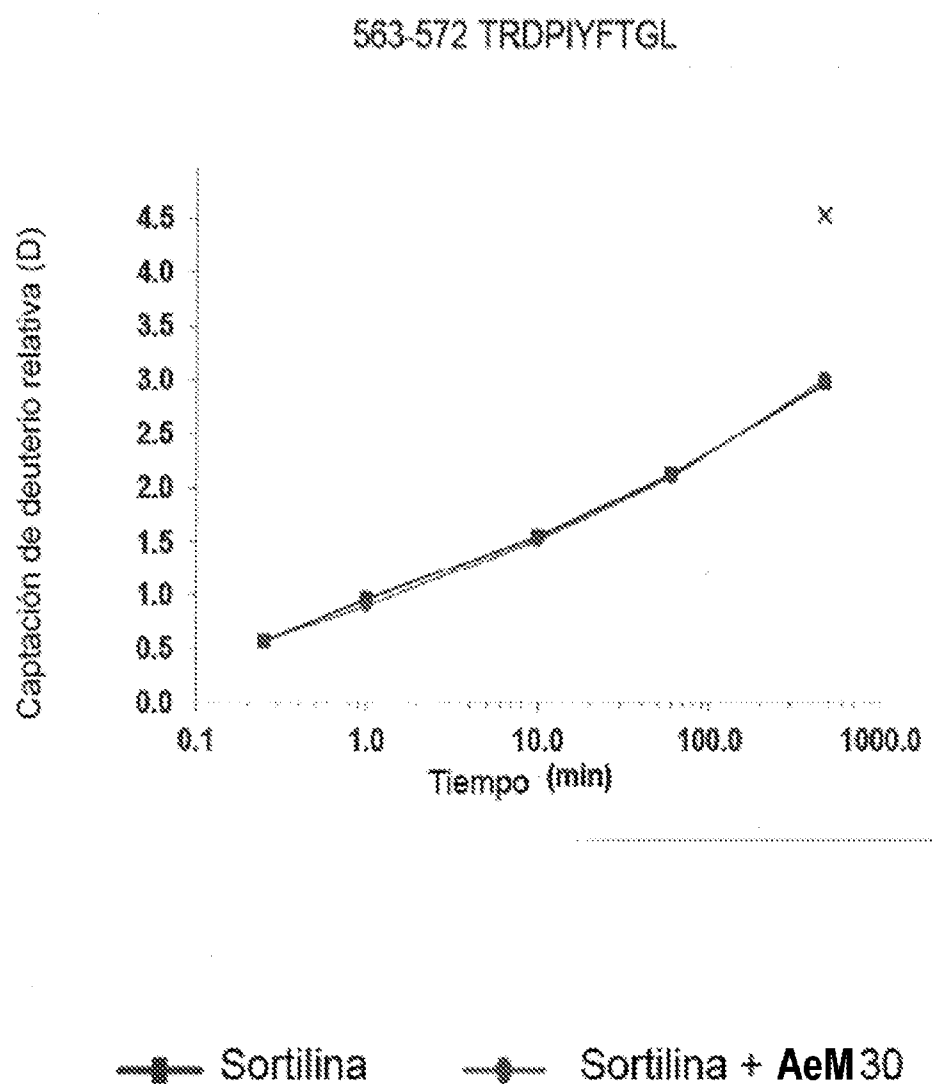
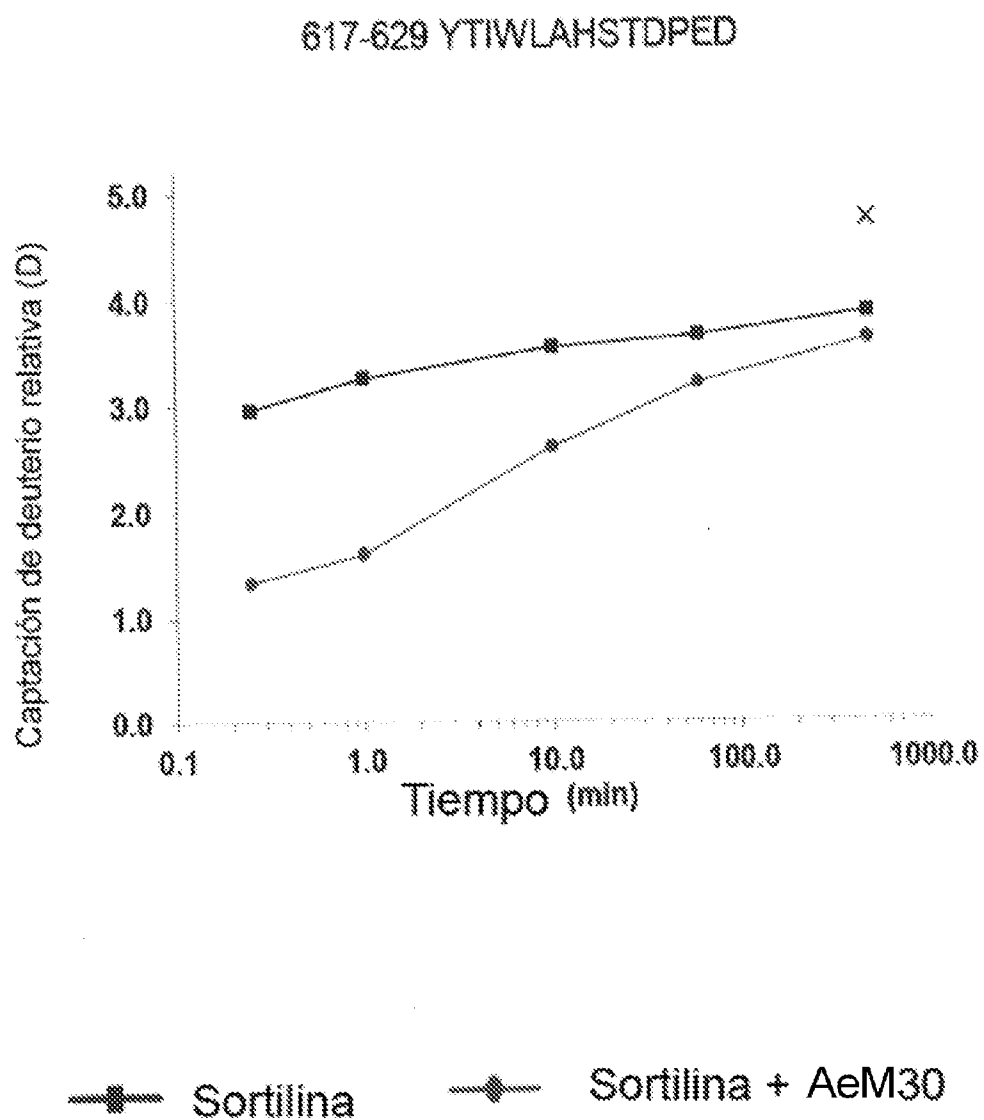
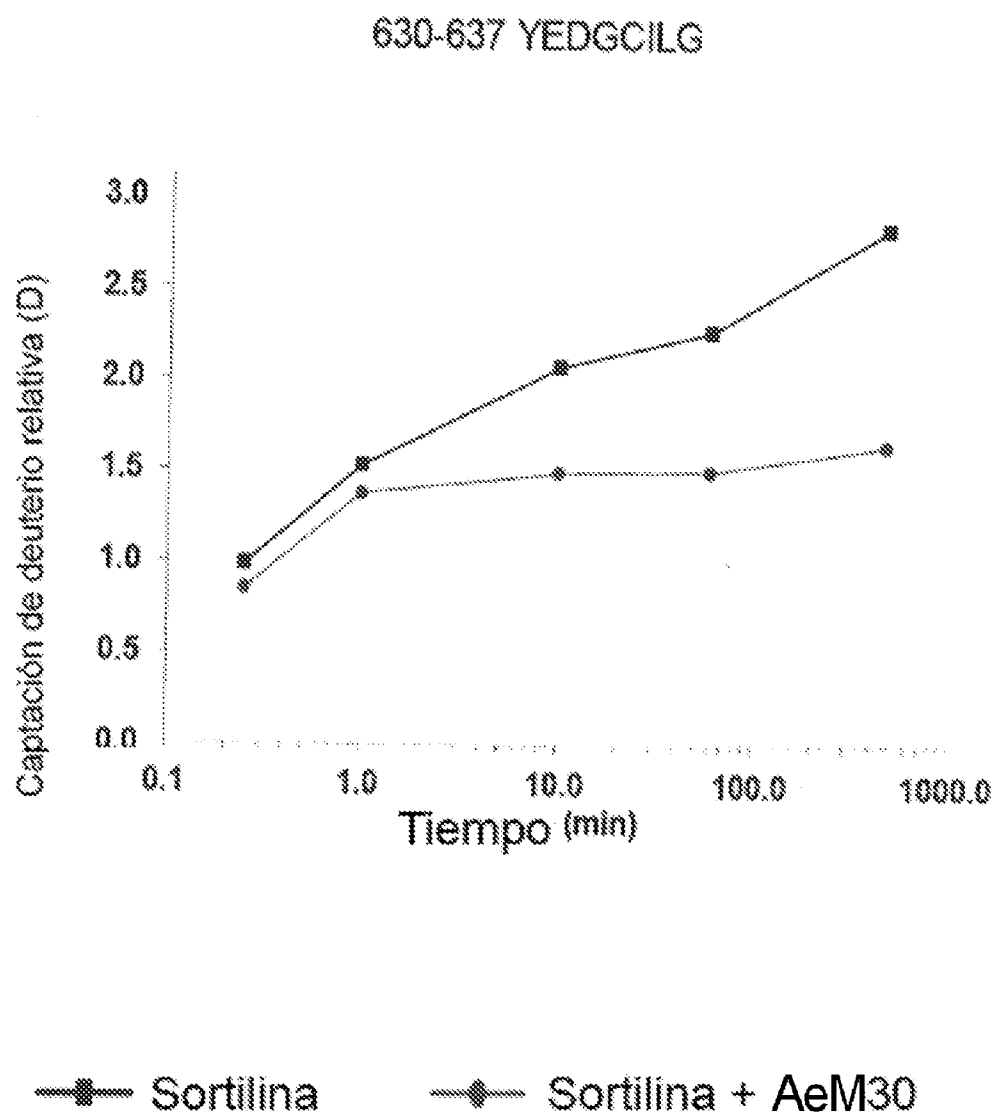


Fig 16 a (1)

**Fig 16 a (2)**

**Fig 16 a (3)**

637-642 GYKEQF

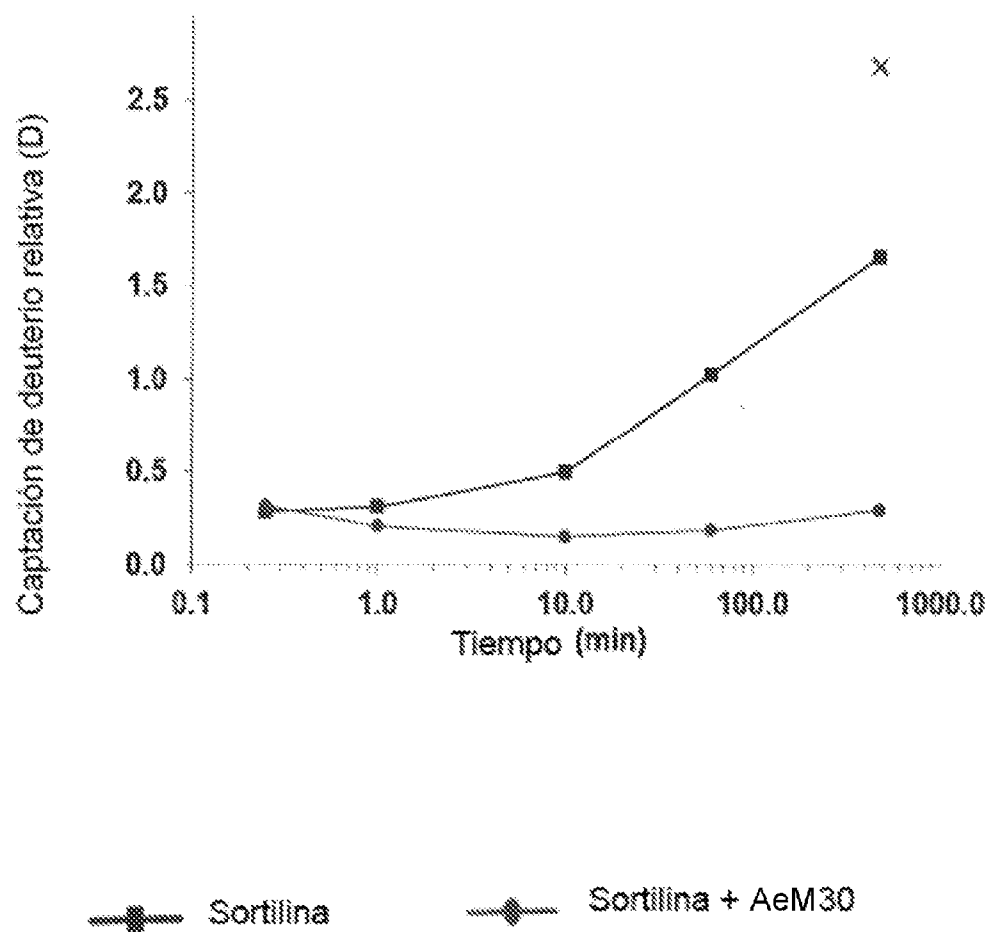
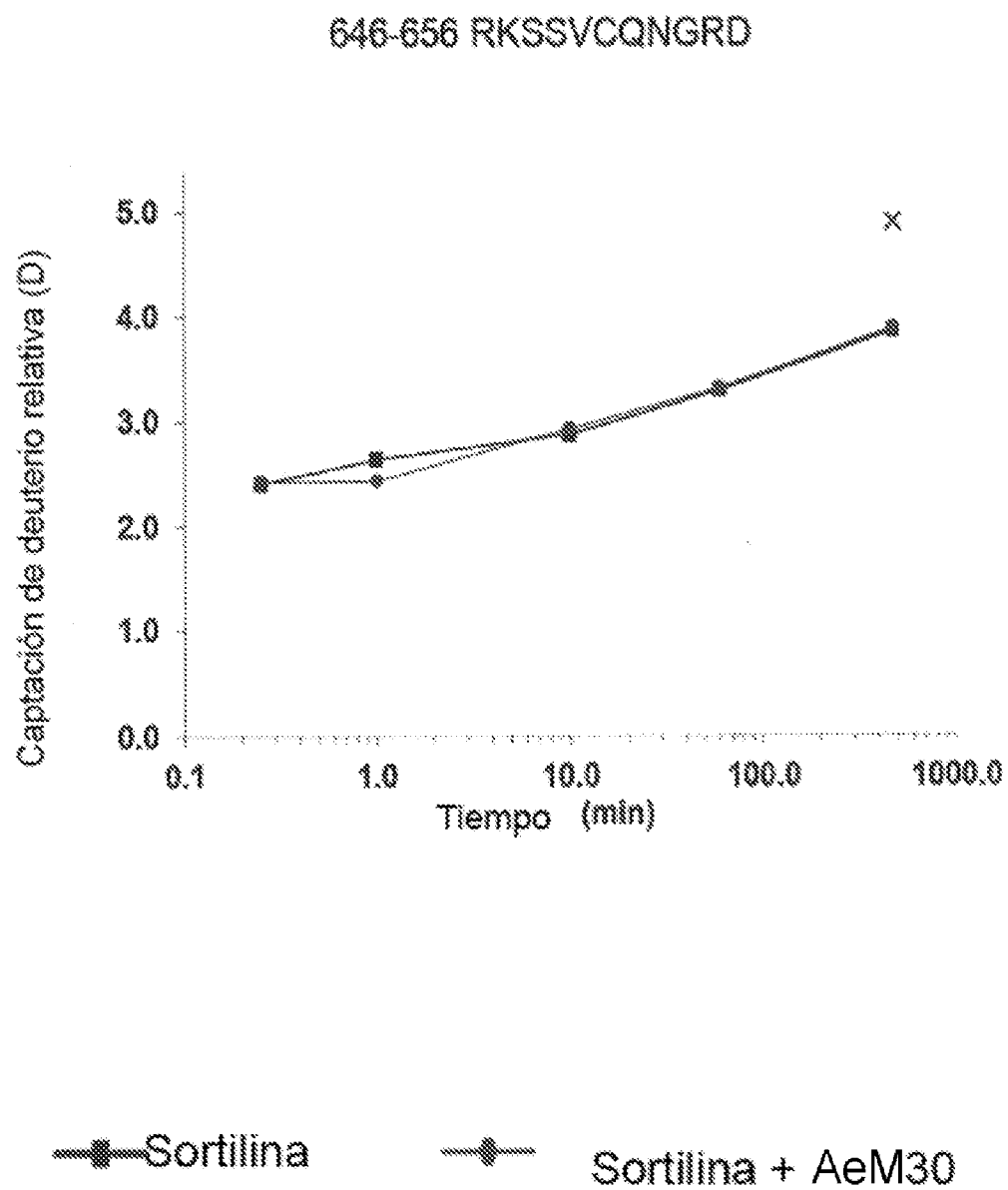
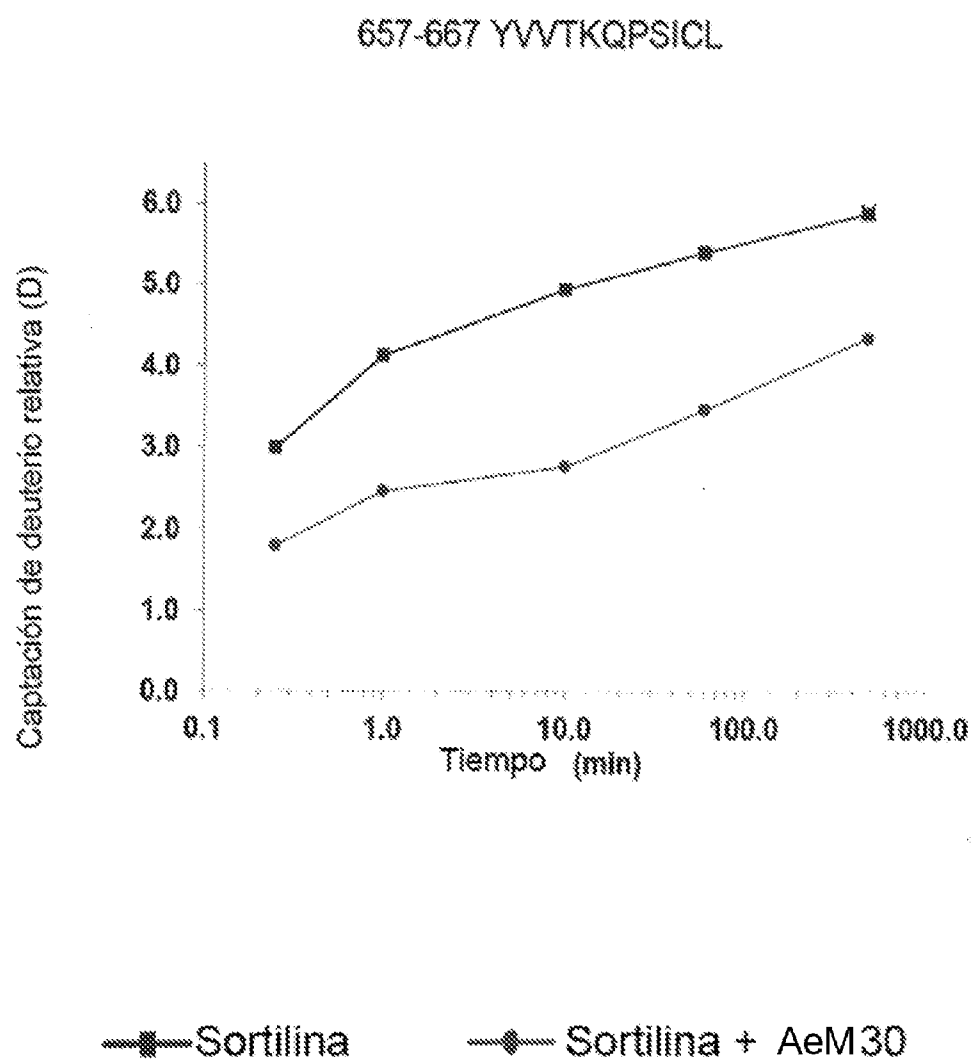
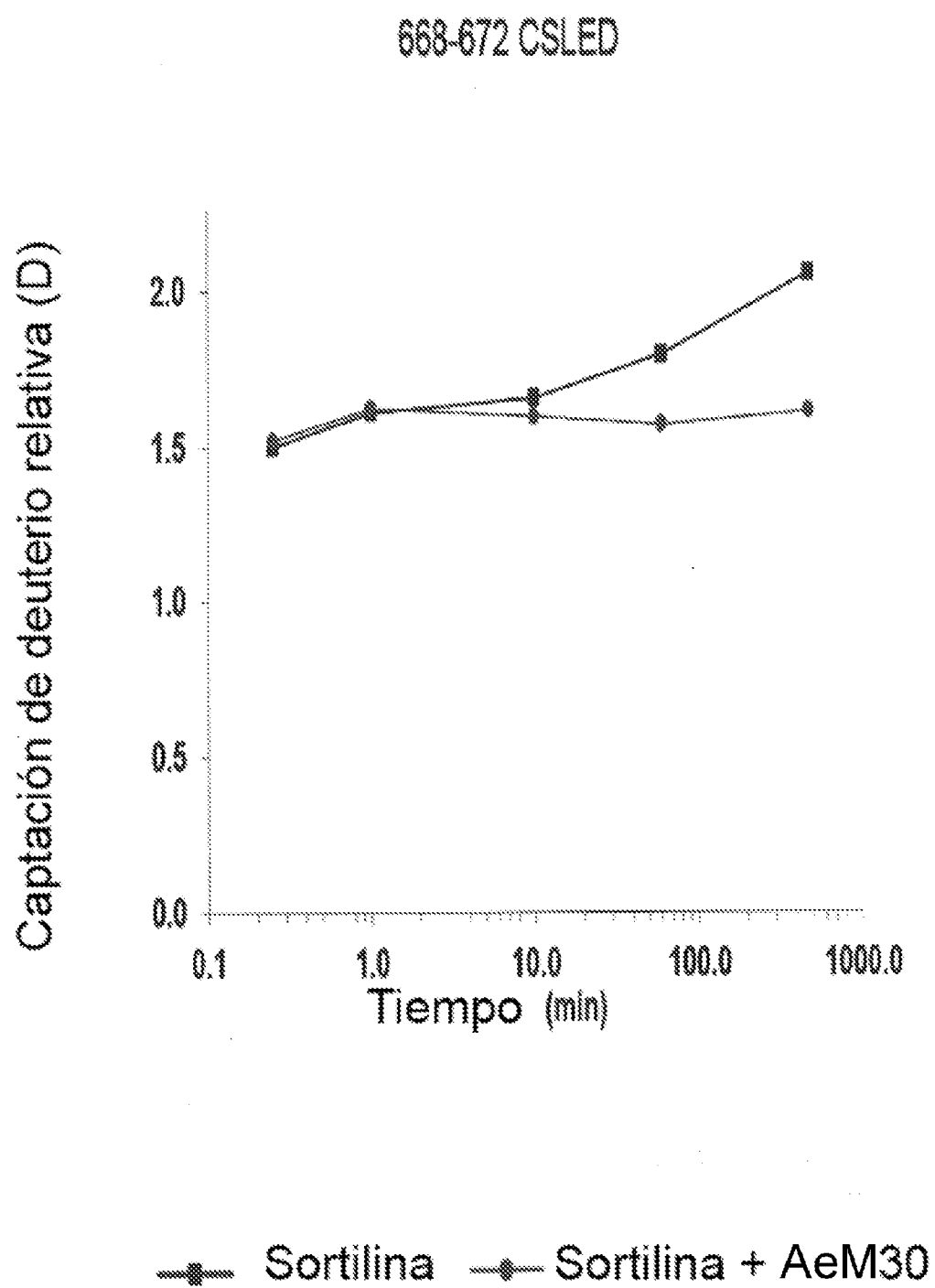


Fig 16 a (4)

**Fig 16 a (5)**

**Fig 16 a (6)**

**Fig 16 b (1)**

704-714 YGREEHLTTNG

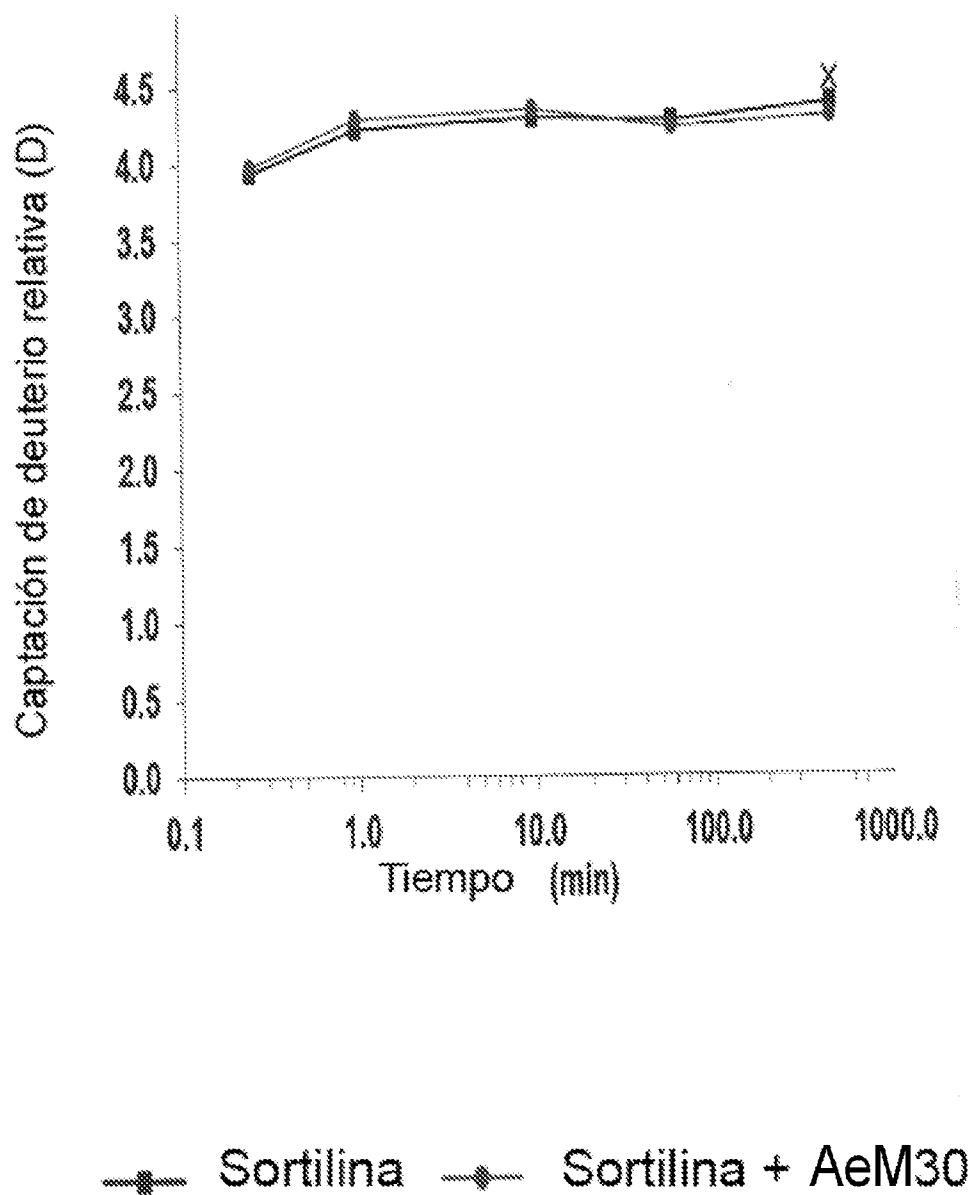


Fig 16 b (2)

715-728 YRKIPGDKCQGGVN

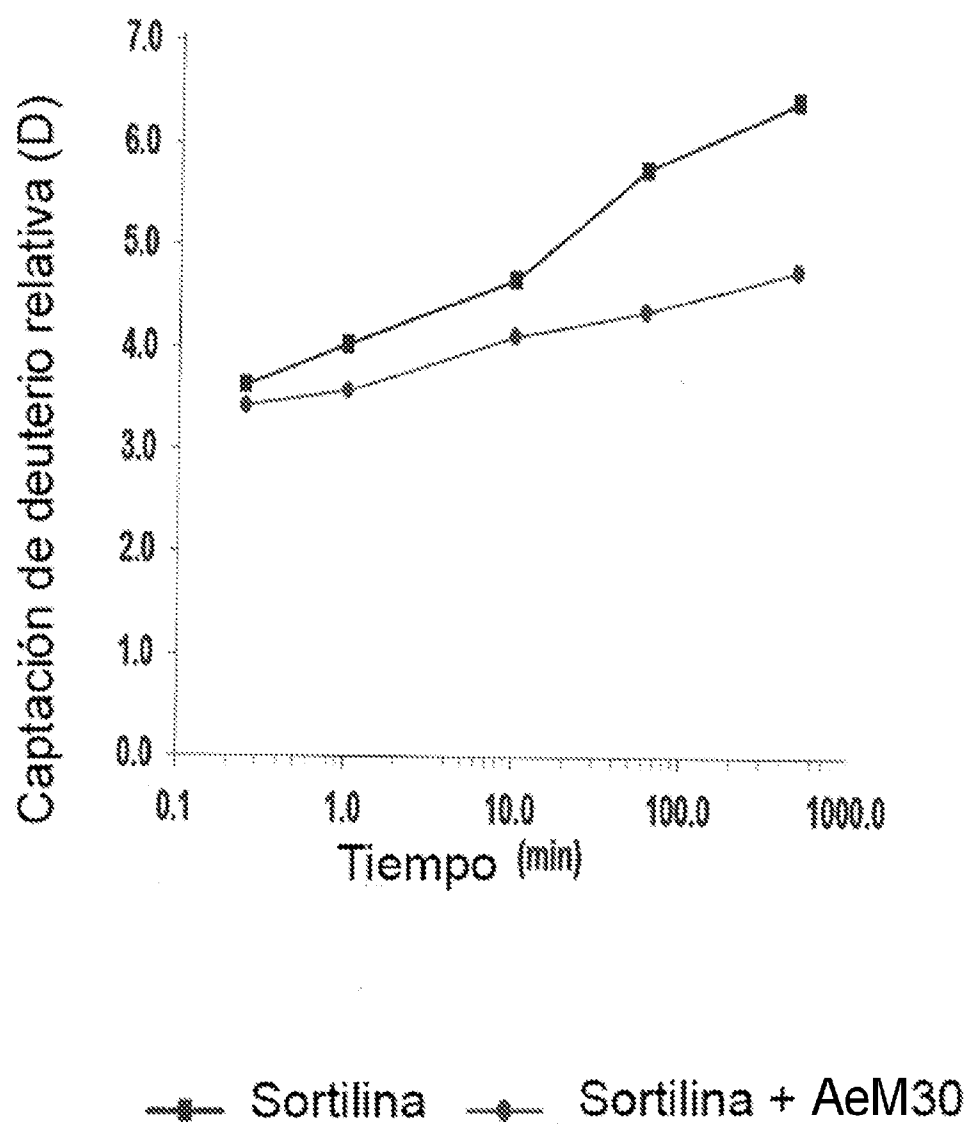


Fig 16 b (3)

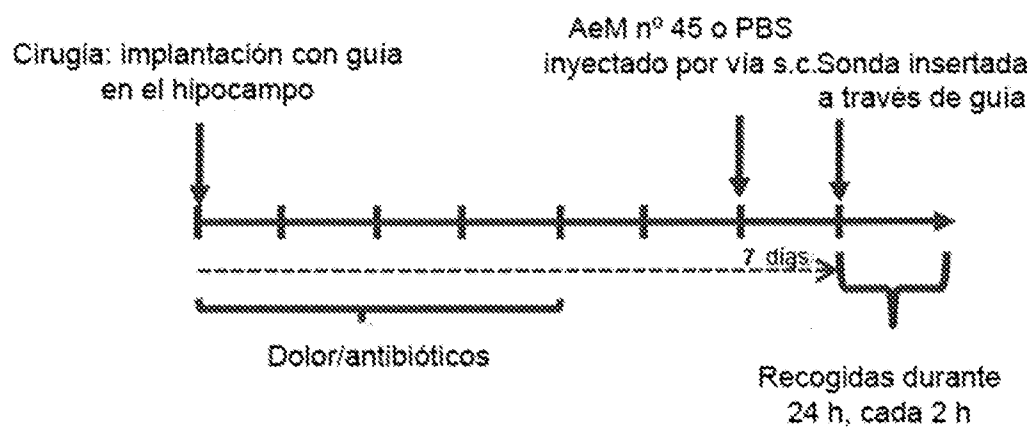
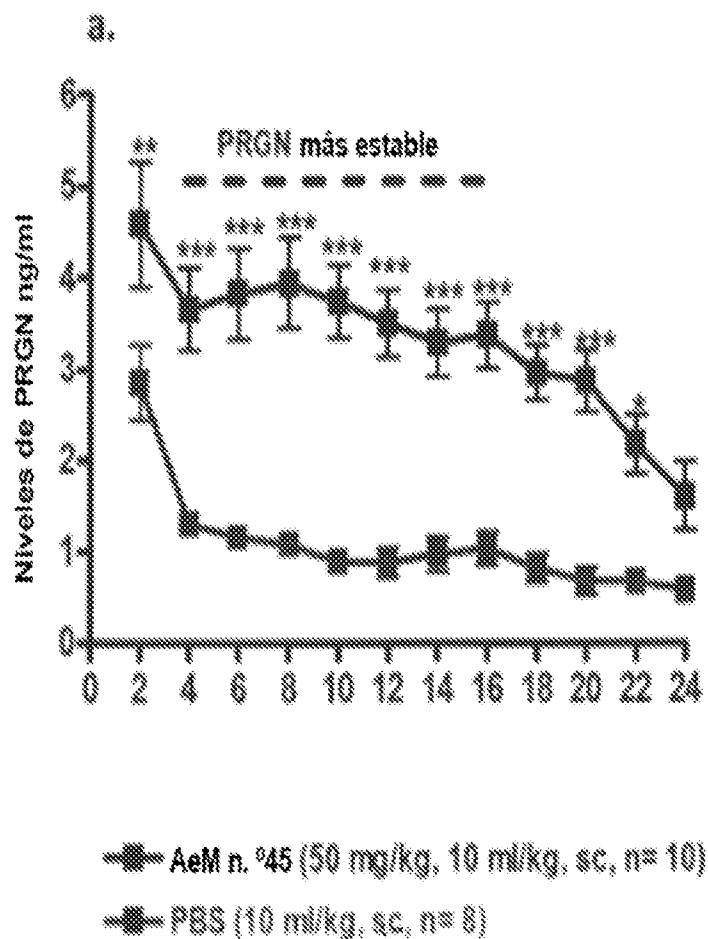
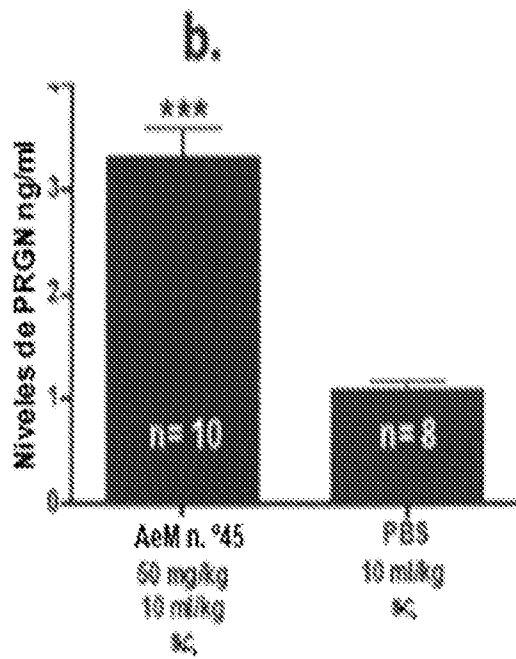


Fig. 17



datos: medios \pm E.E.M ; *, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ AeM n. 45 frente a PBS,
ANOVA de dos vías seguido por prueba posterior de Bonferroni

Fig. 18a



24 → 48 h tras la dosificación

Datos: medios \pm E.E.M; *** $p < 0.001$, AeM n.º45 frente a PBS, prueba de la t

Fig. 18b

C.

tiempo (h)	AeM n.º45			POS		
	Y	F.E.M	N	Y	F.E.M	N
2	4.587163	0.684416	10	2.854475	0.4111770	8
4	3.654225	0.453960	10	1.303813	0.129774	8
6	3.826151	0.499164	10	1.157348	0.103958	8
8	3.941664	0.495235	10	1.084373	0.102409	8
10	3.744573	0.396738	10	0.885935	0.139000	8
12	3.498750	0.369875	10	0.880561	0.161299	8
14	3.287708	0.362766	10	0.966836	0.190743	8
16	3.372367	0.365127	10	1.031850	0.180413	8
18	2.962828	0.298671	10	0.817940	0.158949	8
20	2.868918	0.343551	10	0.681344	0.153457	8
22	2.173472	0.322487	10	0.673761	0.122029	8
24	1.604464	0.377046	10	0.583756	0.123556	8

BS,

Fig. 18c