

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 844**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/46** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61K 51/10** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 5/16** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2018** **PCT/CA2018/050875**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2019** **WO19014768**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2018** **E 18835520 (0)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024** **EP 3574020**

54 Título: **Anticuerpos contra beta amiloide**

30 Prioridad:

**18.07.2017 WO PCT/CA2017/050866**  
**09.11.2017 US 201715808842**  
**25.01.2018 US 201862622126 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.10.2024**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (50.0%)**  
**University - Industry Liaison Office , 103-6190**  
**Agronomy Road**  
**Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, CA y**  
**PROMIS NEUROSCIENCES INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CASHMAN, NEIL R.;**  
**PLOTKIN, STEVEN S.;**  
**KAPLAN, JOHANNE;**  
**SILVERMAN, JUDITH MAXWELL y**  
**GIBBS, EBRIMA**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

Observaciones:

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

ES 2 984 844 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 contra beta amiloide

### 5 Campo

La presente descripción se refiere a anticuerpos humanizados que son selectivos para oligómeros de beta amiloide (A-beta o A $\beta$ ), así como a composiciones y usos de los mismos.

### 10 Antecedentes

La beta amiloide (A-beta), que existe como un péptido de 36 a 43 aminoácidos, es un producto liberado a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) por las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa. En pacientes con EA, A-beta puede estar presente en monómeros solubles, fibrillas insolubles y oligómeros solubles. En forma de monómero, A-beta existe como una cadena polipeptídica predominantemente no estructurada. En forma de fibrillas, A-beta puede agregarse en distintas morfologías, a menudo denominadas cepas. Varias de estas estructuras se han determinado mediante RMN de estado sólido.

Por ejemplo, las estructuras para varias cepas de fibrillas están disponibles en el Protein Data Bank (PDB), una base de datos cristalográfica de datos estructurales tridimensionales de resolución atómica, que incluye una estructura A $\beta$  triplemente simétrica (entrada PDB, 2M4J); una estructura simétrica doble de monómeros A $\beta$ -40 (entrada PDB 2LMN) y una estructura de registro paralela de cadena sencilla de monómeros A $\beta$ -42 (entrada PDB 2MXU).

La estructura de 2M4J se informa en Lu y col [8], y la estructura de 2MXU se informa en Xiao y col [9]. La estructura de 2LMN se describe en Petkova y col [10].

Se ha demostrado que los oligómeros A-beta destruyen líneas celulares y neuronas en cultivo y bloquean una actividad sináptica crítica que favorece la memoria, conocida como potenciación a largo plazo (LTP), en cultivos en rodajas y en animales vivos.

La estructura del oligómero no se ha determinado hasta la fecha. Además, la RMN y otras pruebas indican que el oligómero no existe en una única estructura bien definida, sino en un conjunto estructural conformacionalmente plástico y maleable con regularidad limitada. Además, la concentración de especies de oligómeros tóxicos está muy por debajo de la del monómero o de la fibrilla (las estimaciones varían, pero son del orden de 1000 veces menos o más), lo que hace que esta diana sea difícil de alcanzar.

Se han descrito anticuerpos que se unen a A-beta.

El documento WO2009048538A2 titulado USO DE ANTICUERPO ANTI-AMILOIDE EN ENFERMEDADES OCULARES describe anticuerpos quiméricos que reconocen uno o más sitios de unión en A-beta y son útiles para el tratamiento de enfermedades oculares.

El documento US9221812B2 titulado COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS CON PROTEÍNAS AMILOIDES O SIMILARES A AMILOIDES describe composiciones farmacéuticas y anticuerpos discontinuos que se unen a A-beta incluyendo un epítipo entre los residuos de aminoácidos 12 a 24 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con amiloide.

El documento WO2003070760A2 titulado ANTICUERPOS ANTI-AMILOIDE BETA Y SU USO describe anticuerpos que reconocen un epítipo discontinuo A-beta, en donde la primera región comprende la secuencia de aminoácidos AEFRHDSGY o un fragmento de la misma y en donde la segunda región comprende la secuencia de aminoácidos VHHQKLVFFAEDVG o un fragmento de la misma.

El documento US20110171243A1 titulado COMPUESTOS QUE TRATAN AMILOIDOSIS describe un mimotopo peptídico capaz de inducir la formación *in vivo* de anticuerpos que se unen a HQKLVF y/o HQKLVFFAED, y su uso.

Los documentos WO2008088983A1 y WO2001062801A2 describen un fragmento de anticuerpo pegilado que se une a los aminoácidos 13-28 de A-beta y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con A-beta. Solanezumab y crenezumab se unen a los aminoácidos 16-26 en A-beta. Crenezumab interactúa con el monómero, el oligómero y la fibrilla. Los anticuerpos de la región media, incluidos solanezumab (afinidad picomolar) y crenezumab (afinidad nanomolar), parecen unirse preferentemente a A-beta monomérico [13].

El documento WO2009149487A2, titulado COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE SÍNTOMAS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DE PARKINSON, describe compuestos que comprenden un péptido que tiene capacidad de unión para un anticuerpo específico para un epítipo A-beta tal como EVHHQKL, HQKLVF y HQKLVFFAED.

El dominio HHQK (Id. de sec. n.º 7) se describe como implicado en la inducción de neurotoxicidad en placas en la microglía humana, como se describe en Giulian D y col. [11] y Winkler y col. [12]. Se han descrito agentes

terapéuticos sin anticuerpos que se unen a HHQK (Id. de sec. n.º: 7) para el tratamiento de enfermedades de plegamiento de proteínas (US20150105344A1, WO2006125324A1).

5 patentes estadounidenses 5.766.846; 5.837.672; y 5.593.846 describen la producción de anticuerpos monoclonales murinos contra el dominio central del péptido Aβ. El documento WO 01/62801 describe anticuerpos que se unen a A-beta entre los aminoácidos 13-28. El documento WO2004071408 describe anticuerpos humanizados.

10 El documento WO2009086539A2 titulado TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE LA AMILOIDOSIS está dirigido a la amiloidosis y la amiloidosis de cadena ligera amiloide, mediante la administración de péptidos que comprenden neoepítopos, tales como fragmentos de proteína amiloide A (AA) de una región C-terminal de AA, y anticuerpos específicos para neoepítopos de proteínas amiloides agregadas, por ejemplo, anticuerpos específicos para la región C-terminal de las fibrillas de AA.

15 El documento WO2003070760 titulado ANTICUERPOS ANTI-AMILOIDE BETA Y SU USO se refiere a moléculas de anticuerpos capaces de reconocer específicamente dos regiones del péptido R-A4, en donde la primera región comprende la secuencia de aminoácidos AEFRHDSGY o un fragmento de la misma y en donde la segunda región comprende la secuencia de aminoácidos VHHAEDVFFAEDVG o un fragmento de la misma.

20 El documento WO2006066089 titulado ANTICUERPOS BETA AMILOIDE HUMANIZADOS PARA SU USO EN LA MEJORA DE LA COGNICIÓN se refiere a agentes y métodos mejorados para el tratamiento de enfermedades asociadas con beta amiloide y, en particular, a la identificación y caracterización de un anticuerpo monoclonal, 12A11, que se une específicamente al péptido Aβ y es eficaz para reducir la carga de placa asociada con trastornos amiloidogénicos (por ejemplo, EA).

25 El documento WO2007068429 titulado ANTICUERPOS CONTRA EL AMILOIDE BETA 4 CON GLICOSILADO EN LA REGIÓN VARIABLE se refiere a una preparación de molécula de anticuerpo purificada que se caracteriza porque al menos un sitio de unión al antígeno comprende una asparagina glicosilada (Asn) en la región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>).

30 El documento WO 03/016466 se refiere a anticuerpos variantes 266 que están diseñados para carecer de un sitio de N-glicosilación dentro de la CDR2 de la cadena pesada, composiciones farmacéuticas de los mismos y secuencias de polinucleótidos, vectores y células transformadas útiles para expresar los anticuerpos variantes. Se describe que las variantes secuestran el péptido A-beta soluble de fluidos biológicos humanos y se unen específicamente a un epítipo contenido en la posición 13-28 del péptido beta amiloide.

35 Yu y col. describen un Aβ1-15 (6Aβ15) plegable hexavalente fusionado a PADRE o proteínas transportadoras derivadas de toxinas. Wang y col 2016 informan que la administración periférica de este anticuerpo mitiga la patología similar a la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo en un animal transgénico con enfermedad de Alzheimer envejecida [14], [15].

40 El documento WO 2017/079833 A1 describe anticuerpos monoclonales murinos generados contra un péptido HHQK cíclico. Son deseables anticuerpos que se unen preferencial o selectivamente a oligómeros A-beta sobre monómeros o sobre fibrillas o sobre monómeros y fibrillas.

#### 45 **Resumen**

La presente invención, en sus diversos aspectos, es tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

50 Un aspecto incluye un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 46; y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 66; y el anticuerpo humanizado se une a los oligómeros beta amiloides.

55 En una realización, el anticuerpo es un fragmento de unión a anticuerpo de un anticuerpo descrito en la presente memoria seleccionado de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos.

Un aspecto incluye un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo humanizado descrito en la presente memoria y un marcador detectable o agente citotóxico.

60 Un aspecto incluye una composición que comprende el anticuerpo descrito en la presente memoria, o el inmunoconjugado descrito en la presente memoria y un diluyente.

65 Un aspecto incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una porción proteica del anticuerpo descrito en la presente memoria.

Un aspecto incluye un vector que comprende el ácido nucleico descrito en la presente descripción.

Un aspecto incluye una célula que expresa un anticuerpo descrito en la presente memoria.

5 Un aspecto incluye el inmunoconjugado descrito en la presente memoria para su uso en la medición de un nivel de A-beta en un sujeto en riesgo o sospechoso de tener o que tiene EA, en donde el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable.

En una realización, el marcador es un radionucleido emisor de positrones.

10 Un aspecto incluye el anticuerpo o inmunoconjugado descrito en la presente memoria, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o inmunoconjugado según la invención para su uso en el tratamiento de la EA, la demencia con cuerpos de Lewy y/o la angiopatía amiloide cerebral en un sujeto que lo necesita, preferiblemente en donde el anticuerpo o el inmunoconjugado se administra directamente al cerebro u otra porción del SNC.

15 En una realización, se evalúa la presencia o los niveles de A-beta en una muestra biológica del sujeto a tratar utilizando un anticuerpo descrito en la presente memoria.

Otras características y ventajas de la presente descripción resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

20 Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

## 25 **Breve descripción de los dibujos**

La presente descripción se describirá ahora en relación con los dibujos en los que:

30 la Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de los anticuerpos sobre la propagación de oligómeros A-beta in vitro.

La Figura 2 es un gráfico que muestra que el anticuerpo humanizado muestra una unión significativamente mejor a la fracción LMW enriquecida con oligómero tóxico del extracto de EA.

35 Las Figuras 3A a 3F son una serie de secciones de cerebro teñidas con diversos anticuerpos Abeta y de control.

La Figura 4A es una traza de un extracto de cerebro soluble de EA separado

Las Figuras 4B a 4D son gráficos que muestran los niveles de A-beta detectados en fracciones LMW y HMW.

40 La Figura 5A es un gráfico que muestra niveles de IgG humana detectables en cerebro y plasma 24 horas después de la inyección de anticuerpos anti-Abeta.

La Figura 5B es un gráfico que muestra los niveles de penetrancia del SNC del anticuerpo anti-Abeta.

45 Las Figuras 5C y 5D muestran niveles de IgG detectados en cerebro y plasma o ratones no transgénicos y App/PS1 1-21 días después de la inyección de anticuerpos anti-Abeta.

## **Descripción detallada de la descripción**

50 En la presente memoria se proporcionan anticuerpos humanizados que comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 46; la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 66; y el anticuerpo humanizado se une a oligómeros de beta amiloide, sus composiciones inmunoterapéuticas y sus métodos de uso. Dichos anticuerpos  
55 pueden apuntar a epítomos preferentemente accesibles en especies oligoméricas tóxicas de A-beta, incluidas especies oligoméricas asociadas con la enfermedad de Alzheimer (EA).

60 Como se muestra en los ejemplos, los anticuerpos generados usando un péptido cíclico que comprende HHQK (Id. de sec. n.º: 7), unieron preferentemente A-beta oligomérico y/o unieron selectivamente el péptido cíclico en comparación con un péptido lineal de la misma secuencia (por ejemplo, la secuencia lineal correspondiente). Se describen resultados experimentales e identifican anticuerpos específicos de epítomo y conformacionalmente selectivos que se unen al oligómero sintético de forma selectiva en comparación con los monómeros sintéticos, se unen al LCR de pacientes con EA preferentemente sobre el LCR de control y/o se unen al extracto de cerebro soluble de pacientes con EA preferentemente sobre el extracto de cerebro soluble de control. Una tinción adicional  
65 del tejido cerebral con EA identificó anticuerpos que muestran una unión a la placa nula o insignificante y los estudios in vitro encontraron que los anticuerpos inhibían la propagación y agregación del oligómero Aβ.

Como se muestra además en los ejemplos, el anticuerpo humanizado 301-17 que tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 46 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 66 mostraron características mejoradas, como una unión mejorada de A-beta oligomérica en comparación con el anticuerpo monoclonal de ratón. Los anticuerpos humanizados también tenían una especificidad mejorada en comparación con el monoclonal parental.

Por ejemplo, el anticuerpo humanizado tiene una unión aumentada, tal como un aumento del 50 % o hasta un 200 % (o cualquier número intermedio) en comparación con el anticuerpo monoclonal de ratón, a A-beta oligomérica, opcionalmente Abeta oligomérica presente en fracciones de bajo peso molecular de muestras como extractos de cerebro u otras muestras biológicas.

#### I. Definiciones

Tal como se usa en la presente memoria, el término "A-beta" puede denominarse alternativamente "beta amiloide", "β amiloide", A-beta, A-beta o "Aβ". La beta amiloide es un péptido de 36 a 43 aminoácidos e incluye todas las formas de tipo natural y mutantes de todas las especies, particularmente la beta A humana. A-beta40 se refiere a la forma de 40 aminoácidos; A-beta42 se refiere a la forma de 42 aminoácidos, etc. La secuencia de aminoácidos de A-beta42 de tipo natural humano se muestra en la Id. de sec. n.º: 73.

Como se usa en la presente memoria, el término "monómero A-beta" en la presente memoria se refiere a cualquiera de las formas de subunidades individuales del péptido A-beta (por ejemplo, 1-40, 1-42, 1-43).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "oligómero A-beta" se refiere a una pluralidad de cualquiera de las subunidades A-beta en donde que varios (por ejemplo, al menos dos) monómeros A-beta se agregan de forma no covalente en un glóbulo tridimensional conformacionalmente flexible y parcialmente ordenado de menos de 100 monómeros, o más típicamente menos de 50 monómeros. Por ejemplo, un oligómero puede contener 3, 4, 5 o más monómeros. El término "oligómero A-beta", tal como se usa en la presente memoria, incluye tanto oligómero A-beta sintético como/u oligómero A-beta nativo. "Oligómero A-beta nativo" se refiere a oligómero A-beta formado in vivo, por ejemplo en el cerebro y el LCR de un sujeto con EA.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "fibrilla A-beta" se refiere a una estructura molecular que comprende conjuntos de péptidos A-beta individuales asociados no covalentemente que muestran una estructura fibrilar bajo un microscopio electrónico. La estructura fibrilar suele ser una estructura "beta cruzada"; no existe un límite superior teórico para el tamaño de los multímeros y las fibrillas pueden comprender miles o muchos miles de monómeros. Las fibrillas pueden agregarse por miles para formar placas seniles, una de las principales morfologías patológicas diagnósticas de la EA.

El término "HHQK" significa la secuencia de aminoácidos histidina, histidina, glutamina, lisina, como se muestra en la Id. de sec. n.º: 7. Dependiendo del contexto, la referencia de la secuencia de aminoácidos puede referirse a una secuencia en A-beta o a un péptido aislado, como la secuencia de aminoácidos de un compuesto cíclico.

El término "aminoácido" incluye todos los aminoácidos de origen natural así como también los aminoácidos modificados. Los átomos del aminoácido pueden incluir diferentes isótopos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden comprender deuterio sustituido por hidrógeno, nitrógeno-15 sustituido por nitrógeno-14, y carbono-13 sustituido por carbono-12 y otros cambios similares.

El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, remodelados, humanizados y otros anticuerpos quiméricos y fragmentos de unión de los mismos, incluyendo, por ejemplo, un fragmento Fab de cadena sencilla, un fragmento Fab'2 o un fragmento Fv de cadena sencilla. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producirse en animales tales como conejos, llamas, tiburones, etc. También se incluyen anticuerpos humanos que pueden producirse en animales transgénicos o usando técnicas bioquímicas o pueden aislarse de una biblioteca tal como una biblioteca de fagos. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos quiméricos pueden incluir secuencias de uno o más de un isotipo, clase o especie.

La expresión "anticuerpo aislado" se refiere a anticuerpo producido in vivo o in vitro que ha sido eliminado de la fuente que produjo el anticuerpo, por ejemplo, un animal, hibridoma u otra línea celular (tal como células recombinantes de insecto, levadura o bacteria que producen anticuerpo). El anticuerpo aislado se "purifica" opcionalmente, lo que significa al menos: el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de pureza.

El término "fragmento de unión", como se usa en la presente memoria, a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo y que se une al antígeno o compite con el anticuerpo intacto. Los fragmentos de unión a modo de ejemplo incluyen, sin limitaciones, Fab, Fab', F(ab')2, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, nanocuerpos, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos. Los fragmentos se pueden obtener mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. También se pueden obtener fragmentos por medios recombinantes. Por ejemplo, pueden

generarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> mediante el tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también pueden construirse mediante técnicas de expresión recombinantes.

Los términos “numeración IMGT” o “numeración de base de datos ImMunoGeneTics”, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo.

Como se usa en la presente memoria, el término “epítipo conformacional” se refiere a un epítipo donde la secuencia de aminoácidos del epítipo tiene una estructura tridimensional particular en donde al menos un aspecto de la estructura tridimensional no está presente o es menos probable que esté presente en otra forma para por ejemplo, un péptido lineal correspondiente o monómero A-beta y es reconocido específicamente y/o selectivamente por el anticuerpo afín. Los anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo específico de conformación reconocen la disposición espacial de uno o más de los aminoácidos de ese epítipo específico de conformación. Por ejemplo, un epítipo conformacional de HHQK (Id. de sec. n.º: 7) se refiere a un epítipo de HHQK (Id. de sec. n.º: 7) que es reconocido por anticuerpos de forma selectiva, por ejemplo, al menos 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces o 1000 veces o más selectividad en comparación con anticuerpos creados usando HHQK lineal (Id. de sec. n.º: 7). Cuando se dice que un anticuerpo se une selectivamente a un epítipo tal como un epítipo conformacional, tal como HHQK (Id. de sec. n.º: 7), lo que se quiere decir es que el anticuerpo se une preferentemente a una o más conformaciones particulares que contienen los residuos especificados o una parte de los mismos con mayor afinidad que la que une dichos residuos en otra conformación. Por ejemplo, cuando se dice que un anticuerpo se une selectivamente a un ciclopéptido que comprende HHQK o un epítipo relacionado con respecto a un péptido lineal correspondiente, el anticuerpo se une al ciclopéptido con al menos una afinidad 2 veces mayor que la que se une al péptido lineal. De manera similar, cuando se dice que un anticuerpo se une selectivamente a A-beta oligomérico, el anticuerpo se une a la especie oligomérica con al menos una afinidad 2 veces mayor que la que se une al monómero A-beta y/o a las fibrillas de placa.

El término “unión a placa nula o insignificante” o “carece de unión a placa o tiene una unión a placa insignificante”, tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a un anticuerpo, significa que el anticuerpo no muestra tinción típica de morfología de placa en inmunohistoquímica (por ejemplo, in situ, opcionalmente en comparación con la tinción de placa observada con el anticuerpo A-beta 6E10) y el nivel de tinción es comparable o no más de 2 veces el nivel observado con un control de isotipo IgG negativo (por ejemplo, irrelevante).

El término “péptido aislado” se refiere a un péptido que se ha producido, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o sintéticas, y se ha eliminado de la fuente que produjo el péptido, tal como células recombinantes o reactivos de síntesis de péptidos residuales. El péptido aislado está opcionalmente “purificado”, lo que significa al menos: el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de pureza y opcionalmente pureza de grado farmacéutico.

El término “marcador detectable” como se usa en la presente memoria se refiere a restos tales como secuencias peptídicas (como una etiqueta myc, etiqueta HA, etiqueta V5 o etiqueta NE), proteínas fluorescentes que se pueden anexas o introducir en un péptido o compuesto descrito en la presente memoria y que es capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el marcador puede ser un radionucleido emisor de positrones radioopaco (por ejemplo, para uso en obtención de imágenes PET) o un radioisótopo, tal como <sup>3</sup>H, <sup>13</sup>N, <sup>14</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I; un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente de obtención de imágenes; o un ion metálico. El marcador detectable también puede ser detectable indirectamente, por ejemplo, usando un anticuerpo secundario.

El término “epítipo”, tal como se usa comúnmente, significa un sitio de unión de anticuerpo, típicamente un segmento polipeptídico, en un antígeno que es reconocido específicamente por el anticuerpo. Como se usa en la presente memoria, “epítipo” también puede referirse a las secuencias de aminoácidos o parte de las mismas identificadas en A-beta usando el método de coordenadas colectivas descrito. Por ejemplo, un anticuerpo generado contra un péptido aislado correspondiente a un compuesto cíclico que comprende la región diana identificada (HHQK Id. de sec. n.º:7), reconoce parte o la totalidad de dicha secuencia de epítipos. Un epítipo es “accesible” en el contexto de la presente especificación cuando es accesible para su unión mediante un anticuerpo.

El término “mayor afinidad” como se usa en la presente memoria se refiere a un grado relativo de unión de anticuerpo donde un anticuerpo X se une a la diana Y con más fuerza ( $K_{on}$ ) y/o con una constante de disociación menor ( $K_{off}$ ) que a la diana Z, y en este contexto, el anticuerpo X tiene una mayor afinidad por la diana Y que por Z. Asimismo, el término “menor afinidad” en la presente memoria se refiere a un grado de unión del anticuerpo donde un anticuerpo X se une a la diana Y con menos fuerza y/o con una constante de disociación mayor que a la diana Z, y en este contexto el anticuerpo X tiene una menor afinidad por el objetivo Y que por Z. La afinidad de unión entre un anticuerpo y su antígeno objetivo se puede expresar como  $K_A$  igual a  $1/K_D$  donde  $K_D$  es igual para  $K_{on}/K_{off}$ . Los valores de  $K_{on}$  y  $K_{off}$  se pueden medir usando tecnología de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo usando un sistema de detección de afinidad molecular (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburgo, Alemania). Un anticuerpo que es selectivo para una conformación presentada en un compuesto

cíclico opcional, un péptido cíclico, por ejemplo, tiene una mayor afinidad por el compuesto cíclico (por ejemplo, péptido cíclico) en comparación con una secuencia correspondiente en forma lineal (por ejemplo, la secuencia no ciclada).

La expresión “compuesto lineal correspondiente” con respecto a un compuesto cíclico se refiere a un compuesto, opcionalmente un péptido, que comprende o consiste en la misma secuencia o restos químicos que el compuesto cíclico pero en forma lineal (es decir, no ciclado), por ejemplo que tiene propiedades que estarían presentes en la solución de un péptido lineal. Por ejemplo, el compuesto lineal correspondiente puede ser el péptido sintetizado que no está ciclado.

Como se usa en la presente memoria, “se une específicamente” en referencia a un anticuerpo significa que el anticuerpo reconoce una secuencia de epítipo y se une a su antígeno diana con una afinidad mínima. Por ejemplo, un anticuerpo multivalente se une a su diana con una  $K_D$  de al menos  $1e-6$ , al menos  $1e-7$ , al menos  $1e-8$ , al menos  $1e-9$  o al menos  $1e-10$ . Pueden preferirse afinidades superiores a al menos  $1e-8$ . Por ejemplo, la  $K_D$  puede estar en el intervalo nanomolar o picomolar. Un fragmento de unión a antígeno, tal como un fragmento Fab que comprende un dominio variable, puede unirse a su diana con una afinidad 10 o 100 veces menor que una interacción multivalente con un anticuerpo no fragmentado.

El término “se une selectivamente” como se usa en la presente memoria con respecto a un anticuerpo que se une selectivamente a una forma de A-beta (por ejemplo, fibrilla, monómero u oligómero) o un compuesto cíclico significa que el anticuerpo se une a la forma con al menos 2 veces, al menos 3 veces, o al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces o más mayor afinidad. Por consiguiente, un anticuerpo que es más selectivo para una conformación particular (por ejemplo, oligómero) se une preferentemente a la forma particular de A-beta con al menos 2 veces más afinidad, etc., en comparación con otra forma y/o un péptido lineal.

El término “animal” o “sujeto”, tal como se usa en la presente memoria, incluye a todos los miembros del reino animal, incluidos los mamíferos, incluyendo o excluyendo opcionalmente a los seres humanos.

Una “sustitución conservadora de aminoácidos”, como se usa en la presente descripción, es una en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido sin eliminar las propiedades deseadas de la proteína. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos conservadoras adecuadas sustituyendo entre sí aminoácidos con hidrofobicidad, polaridad y longitud de cadena R similares. Los ejemplos de sustitución conservadora de aminoácidos incluyen:

Sustituciones conservadoras	
Tipo de aminoácido	Aminoácidos sustituibles
Hidrófilos	Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr
Sulfhidrilo	Cys
Alifáticos	Val, Ile, Leu, Met
Básicos	Lys, Arg, Su
Aromáticos	Phe, Tyr, Trp

El término “identidad de secuencia” como se usa en la presente memoria se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos o dos secuencias de ácidos nucleicos. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácido nucleico para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas superpuestas/número total de posiciones multiplicado por 100 %). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también se puede lograr usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo se incorpora a los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con los parámetros del programa de nucleótidos NBLAST establecidos, por ejemplo, para puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la presente solicitud. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con los parámetros del programa XBLAST establecidos, por ejemplo, en puntuación -50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en la presente memoria. Para obtener alineamientos con espacios con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul y col., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, se puede usar PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-

Blast, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, el sitio web del NCBI). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o sin espacios. Al calcular el porcentaje de identidad, normalmente sólo se cuentan las coincidencias exactas.

Para los anticuerpos, las identidades de secuencia porcentuales se pueden determinar cuando las secuencias de anticuerpos se alinean al máximo mediante IMGT u otro (por ejemplo, convención de numeración de Kabat). Después del alineamiento, si una región del anticuerpo sujeto (por ejemplo, toda la región variable madura de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones del anticuerpo sujeto y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido en la región del anticuerpo sujeto y de referencia divididas por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar los espacios, multiplicadas por 100 para convertirlas en porcentaje.

La expresión “secuencia de ácido nucleico”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una secuencia de monómeros de nucleósidos o nucleótidos que consiste en bases, azúcares y enlaces entre azúcares (cadena principal) de origen natural. La expresión también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros de origen no natural o porciones de estos. Las secuencias de ácido nucleico de la presente solicitud pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases de origen natural que incluyen adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Los ejemplos de tales bases modificadas incluyen aza y deaza adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina. El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario y representa la cadena sentido o antisentido. Además, el término “ácido nucleico” incluye las secuencias de ácidos nucleicos complementarias así como codones optimizados o equivalentes de codones sinónimos. La expresión “secuencias de ácido nucleico aislado” como se usa en la presente descripción se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos, u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Un ácido nucleico aislado también está sustancialmente libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) del que se deriva el ácido nucleico.

“Unido operativamente” pretende significar que el ácido nucleico está unido a secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico. Las secuencias reguladoras adecuadas pueden derivarse de una variedad de fuentes, incluidos genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamíferos o de insectos. La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula huésped elegida y puede ser realizada fácilmente por un experto en la técnica. Los ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen: un promotor y potenciador transcripcional o una secuencia de unión a ARN polimerasa, una secuencia de unión ribosómica, que incluye una señal de inicio de traducción. Además, dependiendo de la célula huésped elegida y del vector empleado, se pueden incorporar al vector de expresión otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de la transcripción.

El término “vector”, como se usa en la presente memoria, comprende cualquier vehículo intermediario para una molécula de ácido nucleico que permite que dicha molécula de ácido nucleico, por ejemplo, se introduzca en células procarióticas y/o eucariotas y/o se integre en un genoma, e incluye plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o vectores virales tales como vectores basados en retrovirales, vectores virales adenoasociados y similares. El término “plásmido”, tal como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a una construcción de material genético extracromosómico, normalmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

Por “condiciones de hibridación al menos moderadamente estrictas” se entiende que se seleccionan condiciones que promueven la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias en solución. La hibridación puede ocurrir con toda o una porción de una molécula de secuencia de ácido nucleico. La porción de hibridación normalmente tiene al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30, 40 o 50) nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica reconocerán que la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico, o híbridos, está determinada por la  $T_m$ , que en los tampones que contienen sodio es función de la concentración y la temperatura del ion sodio ( $T_m = 81,5 \text{ } ^\circ\text{C} - 16,6 (\text{Log}10 [\text{Na}^+] + 0,41(\%(\text{G}+\text{C}) - 600/\text{l}))$ , o ecuación similar). Por consiguiente, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad del híbrido son la concentración y la temperatura del ion de sodio. Para identificar moléculas que son similares, pero no idénticas, a una molécula de ácido nucleico conocida, se puede suponer que una falta de coincidencia del 1 % da como resultado una disminución de aproximadamente 1  $^\circ\text{C}$  en la  $T_m$ , por ejemplo si se buscan moléculas de ácido nucleico que tengan una  $> 95 \%$  de identidad, la temperatura de lavado final se reducirá en aproximadamente 5  $^\circ\text{C}$ . Basándose en estas consideraciones, los expertos en la técnica podrán seleccionar fácilmente las condiciones de hibridación apropiadas. En realizaciones preferidas, se seleccionan condiciones de hibridación estrictas. A modo de ejemplo, se pueden emplear las siguientes condiciones para lograr una hibridación rigurosa: hibridación a 5x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC)/solución de Denhardt 5x/SDS al 1,0 % a  $T_m - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$  basándose en la ecuación anterior, seguido de un lavado de 0,2x SSC/0,1 % SDS a 60  $^\circ\text{C}$ . Las condiciones de hibridación moderadamente estrictas incluyen una etapa de lavado en SSC 3x a 42  $^\circ\text{C}$ . Se entiende, sin embargo, que se pueden



lograr rigurosidades equivalentes usando tampones, sales y temperaturas alternativas. Puede encontrar orientación adicional sobre las condiciones de hibridación en: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002, y en: Sambrook y col., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

- 5 El término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en la presente descripción y como se entiende en la técnica, significa un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, lo que incluye los resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, el alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, la prevención de la propagación de la enfermedad, el retardo o desaceleración de la progresión de la enfermedad, la mejoría o paliación del estado de la enfermedad, la disminución de la recurrencia de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratar” y “tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. “Tratar” y “tratamiento”, como se usan en la presente descripción, también incluyen el tratamiento profiláctico. Por ejemplo, un sujeto con EA en etapa temprana puede tratarse para prevenir la progresión con un compuesto, anticuerpo, inmunógeno, ácido nucleico o composición descritos en la presente memoria para prevenir la progresión.

El término “administrado”, tal como se usa en la presente memoria, significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición de la descripción a una célula o sujeto.

- 20 Como se usa en la presente memoria, la frase “cantidad eficaz” significa una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios para lograr un resultado deseado. Las cantidades eficaces cuando se administran a un sujeto pueden variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

- 25 El término “farmacéuticamente aceptable” significa que el portador, diluyente o excipiente es compatible con los otros componentes de la formulación y no es sustancialmente perjudicial para el receptor de la misma.

- 30 Las composiciones o métodos “que comprenden” o “incluyen” uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no mencionados específicamente. Por ejemplo, una composición que “comprende” o “incluye” un anticuerpo puede contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

- 35 Para comprender el alcance de la presente descripción, el término “que consiste” y sus derivados, como se usa en la presente memoria, pretenden ser términos cerrados que especifiquen la presencia de las características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas indicados, y también excluyan la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas no indicados.

- 40 La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales en la presente descripción incluye todos los números y fracciones subsumidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4 y 5). También debe entenderse que se supone que todos los números y fracciones de estos están modificados por el término “alrededor de”. Además, debe entenderse que “un/a”, “uno” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. El término “aproximadamente” significa más o menos del 0,1 al 50 %, del 5 al 50 %, o del 10 al 40 %, preferiblemente del 10 al 20 %, más preferiblemente del 10 % o el 15 %, del número al que se hace referencia.

- 45 Además, se pretende que las definiciones y realizaciones descritas en secciones particulares sean aplicables a otras realizaciones descritas en la presente descripción para las que son adecuadas, como entendería un experto en la técnica. Por ejemplo, en los siguientes pasajes, se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

- 50 Las formas singulares de los artículos “un/o”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluidas mezclas de los mismos.

- 55 II. Anticuerpos y ácidos nucleicos

En la presente memoria se describen anticuerpos particulares y sus usos.

- 60 Como se demostró en los ejemplos, los anticuerpos obtenidos usando ciclo(CGHHQKG) (Id. de sec. n.º: 12) se secuenciaron, unieron selectivamente el compuesto cíclico en relación con el péptido lineal correspondiente, unieron selectivamente el oligómero A-beta en lugar del monómero, y/o carecieron de tinción apreciable de la placa en el tejido de la EA. Además, dicho anticuerpo fue capaz de inhibir la propagación in vitro de la agregación A-beta.

- 65 Por consiguiente, un aspecto incluye un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 46; la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de

aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 66; y el anticuerpo humanizado se une a los oligómeros beta amiloides.

Por ejemplo, el anticuerpo carece de unión a un péptido lineal que comprende la secuencia HHQK (Id. de sec. n.º: 7), opcionalmente en donde la secuencia del péptido lineal es una versión lineal de una secuencia cíclica usada para generar el anticuerpo, opcionalmente en las condiciones descritas en los ejemplos.

Por ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo en A-beta como está presente in vivo, comprendiendo o consistiendo el epítipo en HHQK (Id. de sec. n.º: 7), o una parte del mismo.

Por ejemplo, el anticuerpo no se une específicamente y/o no es selectivo para péptidos lineales que consisten en HHQK (Id. de sec. n.º: 7). La unión selectiva se puede medir usando un ELISA o medición de resonancia de plasmón superficial, como se describe en la presente memoria.

Por ejemplo, el anticuerpo se une selectivamente a un compuesto cíclico que comprende HHQK (Id. de sec. n.º: 7) o una parte del mismo, opcionalmente en el contexto de ciclo (CGHHQKG) (Id. de sec. n.º: 12) con respecto a un péptido lineal que comprende HHQK (Id. de sec. n.º: 12). NO: 7), opcionalmente en el contexto de CGHHQKG lineal (Id. de sec. n.º: 12). Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo se une selectivamente a HHQK (Id. de sec. n.º: 7) en una conformación cíclica y tiene al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces más selectividad para HHQK (Id. de sec. n.º: 7) en la conformación cíclica en comparación con la HHQK (Id. de sec. n.º: 7) en un compuesto lineal, tal como un compuesto lineal correspondiente, por ejemplo, medido por ELISA o resonancia de plasmón superficial, opcionalmente utilizando un método descrito en la presente memoria.

Por ejemplo, el anticuerpo se une selectivamente a un compuesto cíclico que comprende la secuencia del epítipo con respecto al péptido lineal o una especie de A-beta tal como el oligómero A-beta con respecto al monómero. En una realización, la selectividad es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces más selectivo para el compuesto cíclico y/o oligómero A-beta sobre una especie de A-beta seleccionada entre monómero A-beta y/o fibrilla A-beta y/o HHQK lineal (Id. de sec. n.º: 7), opcionalmente lineal CGHHQKG (Id. de sec. n.º: 12).

Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. La producción de monoclonales se describe en los ejemplos.

Para producir anticuerpos monoclonales, pueden recogerse células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un sujeto inmunizado con un inmunógeno descrito en la presente memoria, y fusionarlas con células de mieloma mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas, inmortalizando así estas células y produciendo células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256:495-497 (1975)), así como otras técnicas como la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor y col., Immunol.Today 4:72 (1983)), la técnica del hibridoma del VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Methods Enzymol, 121 : 140-67 (1986)), y selección de bibliotecas combinatorias de anticuerpos (Huse y col., Science 246:1275 (1989)). Las células de hibridoma pueden tamizarse inmunológicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con los epítopos deseados y los anticuerpos monoclonales pueden aislarse.

También se pueden generar anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, reactivos contra antígenos o moléculas particulares, mediante la selección de bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulinas, o porciones de los mismos, expresados en bacterias con componentes de superficie celular. Por ejemplo, pueden expresarse fragmentos Fab completos, regiones VH y regiones FV en bacterias usando bibliotecas de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Ward y col., Nature 41:544-546 (1989); Huse y col., Science 246:1275-1281 (1989); y McCafferty y col., Nature 348:552-554 (1990).

Como se demuestra en los Ejemplos, se describen anticuerpos humanizados específicos. La humanización de anticuerpos de especies no humanas se ha descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, el documento EP-B1 0 239400 y Carter & Merchant 1997 (Curr Opin Biotechnol 8, 449-454, 1997). Los anticuerpos humanizados también se obtienen fácilmente comercialmente (por ejemplo, Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña).

Se pueden generar formas humanizadas de anticuerpos de roedores mediante injertos de CDR (Riechmann y col. Nature, 332:323-327, 1988). En este enfoque, los seis bucles de CDR que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal de roedor se unen a las correspondientes regiones estructurales humanas. El injerto de CDR a menudo produce anticuerpos con afinidad reducida, ya que los aminoácidos de las regiones estructurales pueden influir en el reconocimiento del antígeno (Foote & Winter. J Mol Biol, 224: 487-499, 1992). Para mantener la afinidad del anticuerpo, a menudo es necesario reemplazar determinados residuos estructurales mediante mutagénesis dirigida u otras técnicas recombinantes y puede ser ayudado por el modelado por computadora del sitio de unión al antígeno (Co y col. J Immunol, 152: 2968-2976, 1994).

También se puede utilizar el método descrito en los ejemplos.

El método puede, por ejemplo, injertar la región variable en una estructura humana y, por ejemplo, introducir mutaciones específicas en la región variable fuera de las CDR.

5 Las formas humanizadas de anticuerpos se obtienen opcionalmente mediante rejuvenecimiento (Pedersen y col. J Mol Biol, 235: 959-973, 1994). En este enfoque sólo se humanizan los residuos superficiales de un anticuerpo de roedor.

La descripción también se refiere a un anticuerpo que compite por la unión a un péptido cíclico que tiene la secuencia de la Id. de sec. n.º: 12, y/o oligómeros A-beta humanos opcionalmente A-beta humanos con un anticuerpo descrito en la presente memoria.

El anticuerpo humanizado de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende: una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 46; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 66.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada está codificada por una secuencia de nucleótidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 45; o un codón degenerado u versión optimizada del mismo; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera codificada es mediante una secuencia de nucleótidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 65 o un codón degenerado u versión optimizada de la misma.

La región variable de cadena pesada comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 46, y la región variable de cadena ligera comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 66.

25 Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo que compite por la unión a un péptido cíclico que tiene la secuencia de la Id. de sec. n.º: 12, y/o oligómeros A-beta humanos con un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena variable de cadena pesada de la Id. de sec. n.º: 46, y la secuencia de la región variable de cadena ligera de la Id. de sec. n.º: 66.

30 Por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente memoria comprende una región constante que tiene i) una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 70 y/o 72; ii) una secuencia de aminoácidos con al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las Id. de sec. n.º: 70 y/o 72; o iii) una secuencia de aminoácidos sustituida de forma conservadora i).

35 Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada está codificada por una secuencia de nucleótidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 69; o un codón degenerado u versión optimizada del mismo; y/o el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 71, o una versión degenerada u optimizada del codón del mismo.

40 Por ejemplo, el anticuerpo humanizado comprende las secuencias de VH2 Vk5.

En una realización preferida de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o un fragmento de unión a anticuerpo, en donde dicho fragmento de unión a anticuerpo se selecciona entre Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, nanocuerpos, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos, preferiblemente en donde el fragmento de unión a anticuerpo es un fragmento Fab.

Por ejemplo, el anticuerpo humanizado es un fragmento Fab.

50 Por ejemplo, el fragmento Fab comprende VH2 Vk5.

En una realización adicional de la invención, el anticuerpo humanizado según la invención comprende la secuencia CH1 y/o CL o una parte de la misma de IgG4, preferiblemente en donde la secuencia CH1 y/o CL comprende la Id. de sec. n.º: 70 o 72 o una parte del mismo, o una variante conservadora del mismo o una secuencia con al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 89 %, el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 70 y/o 72, preferiblemente en donde el anticuerpo comprende la Id. de sec. n.º: 70 y/o 72, y/o CH1 y CH2 de la Id. de sec. n.º: 70 o una variante conservadora de cualquiera de los anteriores o una secuencia con al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 89 %, el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con cualquiera de los anteriores.

60 Por ejemplo, el anticuerpo comprende la porción CH1 y/o CL de IgG4 en la tabla 5, una variante conservadora de la misma o una secuencia con al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 89 %, el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con la misma. En una realización adicional, el anticuerpo comprende secuencias de la tabla 5 o una variante conservadora de la misma o una secuencia con al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 89 %, el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con la misma.

65

Por ejemplo, el anticuerpo comprende una KD de al menos o aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$ , al menos o aproximadamente  $8 \times 10^{-11}$ , al menos o aproximadamente  $6 \times 10^{-11}$ , al menos o aproximadamente  $4 \times 10^{-11}$  o al menos o aproximadamente  $2 \times 10^{-11}$  para el péptido cíclico con secuencia de la Id. de sec. n.º: 12.

5 Los anticuerpos humanos específicos de un antígeno particular pueden identificarse mediante una estrategia de presentación en fagos (Jespers y col. Bio/Technology, 12: 899-903, 1994). En un enfoque, la cadena pesada de un anticuerpo de roedor dirigido contra un antígeno específico se clona y se empareja con un repertorio de cadenas ligeras humanas para su presentación como fragmentos Fab en fagos filamentosos. El fago se selecciona uniéndose al antígeno. La cadena ligera humana seleccionada se empareja posteriormente con un repertorio de cadenas pesadas humanas para su presentación en fagos, y el fago se selecciona nuevamente uniéndose al antígeno. El resultado es un fragmento Fab de anticuerpo humano específico para un antígeno particular. En otro enfoque, se producen bibliotecas de fagos donde los miembros presentan diferentes fragmentos de anticuerpos humanos (Fab o Fv) en sus superficies externas (Dower y col., WO 91/17271 y McCafferty y col., WO 92/01047). Los fagos que presentan anticuerpos con una especificidad deseada se seleccionan mediante enriquecimiento por afinidad con un antígeno específico. El fragmento Fab o Fv humano identificado mediante cualquiera de los métodos se puede reclonar para su expresión como un anticuerpo humano en células de mamífero.

20 Los anticuerpos humanos se obtienen opcionalmente de animales transgénicos (patentes estadounidenses n.ºs 6.150.584; 6.114.598; y 5.770.429). En este enfoque, se elimina el gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) en un ratón mutante quimérico o de línea germinal. Posteriormente se transfiere una matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes. El ratón transgénico resultante es entonces capaz de generar un repertorio completo de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno.

25 Los anticuerpos humanizados normalmente se producen como fragmentos de unión a antígeno tales como Fab, Fab' F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv y fragmentos de anticuerpos de dominio único, o como anticuerpos de cadena única en los que las cadenas pesada y ligera están unidas por un espaciador. Además, los anticuerpos humanos o humanizados pueden existir en forma monomérica o polimérica. El anticuerpo humanizado comprende opcionalmente una cadena no humana y una cadena humanizada (es decir, una cadena pesada o ligera humanizada).

30 Los anticuerpos que incluyen anticuerpos humanizados o humanos se seleccionan de cualquier clase de inmunoglobulinas que incluyen: IgM, IgG, IgD, IgA o IgE; y cualquier isotipo, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado o humano puede incluir secuencias de uno o más de un isotipo o clase.

35 Además, los anticuerpos específicos para los epítomos descritos en la presente memoria se aíslan fácilmente mediante la detección de bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos. Por ejemplo, opcionalmente se selecciona una biblioteca de fagos de anticuerpos usando un epítomo específico de la enfermedad de la presente invención para identificar fragmentos de anticuerpos específicos para el epítomo específico de la enfermedad. Los fragmentos de anticuerpos identificados se usan opcionalmente para producir una variedad de anticuerpos recombinantes que son útiles con diferentes realizaciones de la presente invención. Las bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos están disponibles comercialmente, por ejemplo, a través de Xoma (Berkeley, California). Los métodos para seleccionar bibliotecas de fagos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

45 En una realización preferida de la invención, los anticuerpos aquí descritos pueden ser anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos humanizados descritos también son, en una realización, anticuerpos de cadena sencilla.

La descripción también se refiere a anticuerpos que compiten por la unión a un péptido cíclico que tiene la secuencia de la Id. de sec. n.º: 12, y/o oligómeros A-beta humanos con un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR como se indica en la tabla 2, o que comprende una secuencia como se proporciona en cualquiera de las tablas 3, 4A, 4B y 8.

50 La competencia entre anticuerpos se puede determinar, por ejemplo, usando un ensayo en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo bajo prueba para inhibir la unión específica de un anticuerpo de referencia al antígeno común. Un anticuerpo de prueba compete con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de prueba (por ejemplo, al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces o 20 veces) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % medido en un ensayo de unión competitiva.

55 Por ejemplo, se aísla el anticuerpo. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo exógeno.

60 Por ejemplo, el anticuerpo no se une a A-beta monomérico, por ejemplo en las condiciones descritas en los ejemplos. En una realización, el anticuerpo no se une a A-beta en placas seniles, por ejemplo in situ en tejido cerebral con EA, por ejemplo en las condiciones descritas en los ejemplos.

Por ejemplo, el anticuerpo no se une selectivamente al A-beta monomérico en comparación con el A-beta oligomérico nativo o sintético.

65 Por ejemplo, el oligómero A-beta comprende subunidades A-beta 1-42.

Por ejemplo, el anticuerpo carece de tinción de placa de fibrillas A-beta (también denominada placa senil), medida por ejemplo mediante inmunohistoquímica. La ausencia de tinción de placa se puede evaluar comparándola con un control positivo como los anticuerpos A-beta específicos 6E10 y 4G8 (Biolegend, San Diego, CA) o 2C8 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) y un control de isotipo. Un anticuerpo descrito en la presente memoria carece o tiene una tinción de placa de fibrillas A-beta insignificante si el anticuerpo no muestra una tinción de morfología de placa típica y el nivel de tinción es comparable o no más de 2 veces el nivel observado con un control de isotipo negativo de IgG. La escala puede, por ejemplo, establecer el nivel de tinción con control de isotipo en 1 y con 6E10 en 10. Un anticuerpo carece de tinción de placa de fibrillas A-beta si el nivel de tinción en dicha escala es 2 o menos. En una realización, el anticuerpo muestra una tinción mínima de la placa de fibrillas A-beta, por ejemplo, en la escala anterior, niveles puntuados en menos de aproximadamente o menos de 3.

Un aspecto adicional es un anticuerpo según la invención conjugado con un marcador detectable o agente citotóxico. En una realización, el marcador detectable es un radionucleído emisor de positrones. Se puede utilizar un radionucleído emisor de positrones, por ejemplo, en la obtención de imágenes PET.

La descripción también se refiere a un complejo de anticuerpos que comprende un anticuerpo descrito en la presente memoria y/o un fragmento de unión del mismo y A-beta oligomérico.

Un aspecto adicional es un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito en la presente memoria.

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada o una cadena ligera o partes de las mismas, por ejemplo, que codifican cadenas variables descritas en la presente memoria y versiones optimizadas con codones y degeneradas con codones de los mismos.

La presente descripción también se refiere a variantes de las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo y/o fragmento de unión del mismo descrito en la presente memoria. Por ejemplo, las variantes incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan con las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo y/o el fragmento de unión del mismo descrito en la presente memoria bajo condiciones de hibridación al menos moderadamente estrictas o secuencias de codón degeneradas u optimizadas. En otra realización, las secuencias de ácido nucleico variantes tienen al menos al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, lo más preferiblemente al menos el 80 %, incluso más preferiblemente al menos el 90 % e incluso lo más preferiblemente al menos el 95 % de identidad de secuencia con secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las cadenas variables descritas en la presente memoria.

Un aspecto adicional es un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito en la presente memoria, por ejemplo los ácidos nucleicos mostrados en las Id. de sec. n.º: 45 y 65.

En una realización preferida, dicho ácido nucleico está comprendido en un vector. Por ejemplo, el vector es un vector aislado.

El vector puede ser cualquier vector, incluidos vectores adecuados para producir un anticuerpo y/o unir un fragmento del mismo o expresar una secuencia peptídica descrita en la presente memoria.

Las moléculas de ácido nucleico pueden incorporarse de manera conocida en un vector de expresión apropiado que garantice la expresión de la proteína. Los posibles vectores de expresión incluyen, entre otros, cósmidos, plásmidos o virus modificados (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación defectuosa). El vector debe ser compatible con la célula huésped utilizada. Los vectores de expresión son “adecuados para la transformación de una célula huésped”, lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico que codifica los péptidos correspondientes a los epítomos o anticuerpos descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, el vector es adecuado para expresar, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla mediante terapia génica. El vector puede adaptarse para expresión específica en tejido neural, por ejemplo usando promotores específicos neurales y similares. En una realización, el vector comprende un IRES y permite la expresión de una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. Dichos vectores pueden usarse para administrar anticuerpos in vivo.

Las secuencias reguladoras adecuadas pueden derivarse de una variedad de fuentes, incluidos genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamíferos o de insectos.

Los ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen: un promotor y potenciador transcripcional o una secuencia de unión a ARN polimerasa, una secuencia de unión ribosómica, que incluye una señal de inicio de traducción. Además, dependiendo de la célula huésped elegida y del vector empleado, se pueden incorporar al vector de expresión otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de la transcripción.

Por ejemplo, las secuencias reguladoras dirigen o aumentan la expresión en tejido y/o células neurales.

Por ejemplo, el vector es un vector viral.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden contener un gen marcador que facilita la selección de células huésped transformadas, infectadas o transfectadas con un vector para expresar un anticuerpo o péptido epítipo descrito en la presente memoria.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden contener casetes de expresión que codifican un resto de fusión (es decir, una "proteína de fusión") que proporciona una mayor expresión o estabilidad del péptido recombinante; solubilidad aumentada del péptido recombinante; y ayudar en la purificación del péptido recombinante diana actuando como ligando en la purificación por afinidad, incluyendo, por ejemplo, etiquetas y marcadores descritos en la presente memoria. Además, se puede añadir un sitio de escisión proteolítica a la proteína recombinante diana para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante.

Los sistemas para la transferencia de genes, por ejemplo a neuronas y tejido neural tanto in vitro como in vivo, incluyen vectores basados en virus, más notablemente virus del herpes simple, adenovirus, virus adenoasociado (AAV) y retrovirus, incluidos lentivirus. Los enfoques alternativos para la administración de genes incluyen el uso de ADN plasmídico desnudo, así como complejos de ADN-liposoma. Otro enfoque es el uso de plásmidos AAV en los que el ADN se condensa con policationes y los lípidos quedan atrapados y se introducen en el cerebro mediante la administración intracerebral de genes (Leone y col. solicitud estadounidense n.º 2002076394).

Por consiguiente, la descripción también se refiere a los compuestos, inmunógenos, ácidos nucleicos, vectores y anticuerpos descritos en la presente memoria formulados en vesículas tales como liposomas, nanopartículas y partículas de proteínas virales, por ejemplo, para la administración de anticuerpos, compuestos, inmunógenos y ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. En particular, se pueden usar vesículas de polímeros sintéticos, incluidos polimerosomas, para administrar anticuerpos.

También se proporciona en otro aspecto una célula, opcionalmente una célula aislada y/o recombinante, que expresa un anticuerpo descrito en la presente memoria.

La célula recombinante se puede generar usando cualquier célula adecuada para producir un polipéptido, por ejemplo adecuada para producir un anticuerpo y/o un fragmento de unión del mismo. Por ejemplo, para introducir un ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula, la célula puede transfectarse, transformarse o infectarse, dependiendo del vector empleado.

Las células huésped adecuadas incluyen una amplia variedad de células huésped procariotas y eucariotas. Por ejemplo, las proteínas descritas en la presente memoria pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando baculovirus), células de levadura o células de mamífero.

Por ejemplo, la célula es una célula eucariota seleccionada de una célula de levadura, planta, gusano, insecto, ave, pez, reptil y mamífero.

Por ejemplo, la célula de mamífero es una célula de mieloma, una célula de bazo o una célula de hibridoma.

Por ejemplo, la célula es una célula neural.

Las células huésped de levadura y hongos adecuadas para expresar un anticuerpo o péptido incluyen, entre otras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, los géneros *Pichia* o *Kluyveromyces* y diversas especies del género *Aspergillus*. Los ejemplos de vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1, pMFA, pJRY88 y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los protocolos para la transformación de levaduras y hongos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las células de mamífero que pueden ser adecuadas incluyen, entre otras: COS (por ejemplo, ATCC No. CRL 1650 o 1651), BHK (por ejemplo, ATCC No. CRL 6281), CHO (ATCC No. CCL 61), HeLa (por ejemplo, ATCC No. CCL 2), 293 (ATCC No. 1573) y células NS-1. Los vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión en células de mamíferos generalmente incluyen un promotor (por ejemplo, derivado de material viral tal como poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40), así como otras secuencias de control transcripcional y traduccional. Los ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pCDM8 y pMT2PC.

Por ejemplo, la célula es una célula fusionada tal como una célula de hibridoma, produciendo la célula de hibridoma un anticuerpo específico y/o selectivo para un epítipo o secuencia de epítipo descrito en la presente memoria, que incluye, por ejemplo, que se une selectivamente a oligómeros A-beta sobre monómeros A-beta, se une selectivamente a una secuencia de epítipo presentada en un compuesto cíclico con respecto a un compuesto lineal o carece o tiene una unión a placa insignificante.

### III. Composiciones

Un aspecto adicional es una composición que comprende el anticuerpo descrito en la presente memoria o el inmunoconjugado según la invención y un diluyente.

5 Los diluyentes adecuados para ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas y etanol.

Los diluyentes adecuados para polipéptidos, incluidos anticuerpos o fragmentos de los mismos y/o células incluyen, entre otros, soluciones salinas, soluciones tamponadas de pH y soluciones de glicerol u otras soluciones adecuadas para congelar polipéptidos y/o células.

10 Por ejemplo, la composición es una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos, ácidos nucleicos o vectores descritos en la presente memoria, y que opcionalmente comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden preparar mediante métodos conocidos per se para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a sujetos, opcionalmente como una vacuna, de tal modo que una cantidad eficaz de la sustancia activa se combine en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Las composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, polvos liofilizados o soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener además antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente compatibles con los tejidos o la sangre de un receptor previsto. Otros componentes que pueden estar presentes en tales composiciones incluyen agua, tensioactivos (tales como Tween), alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Se pueden  
25 preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos, tabletas o soluciones o suspensiones concentradas estériles. La composición se puede suministrar, por ejemplo, pero sin limitación, como un polvo liofilizado que se reconstituye con agua estéril o solución salina antes de su administración al paciente.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen composiciones esencialmente químicamente inertes y no tóxicas que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, soluciones de glicerol, etanol, cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosforil-etanolamina (DOPE) y liposomas. Tales composiciones deben contener una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, junto con  
35 una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración directa al paciente.

La composición puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres. tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol,

40 En una realización, la composición comprende un anticuerpo descrito en la presente memoria. Por ejemplo, la composición comprende un anticuerpo descrito en la presente memoria y un diluyente. Por ejemplo, la composición es una composición estéril.

45 La descripción también se refiere a un complejo de anticuerpos que comprende un anticuerpo descrito en la presente memoria y un oligómero A-beta, opcionalmente A-beta. El complejo puede estar en solución o comprendido en un tejido, opcionalmente in vitro.

#### 50 IV. Kits

La descripción también se refiere a un kit que comprende i) un anticuerpo y/o un fragmento de unión del mismo, ii) un ácido nucleico de dicho anticuerpo o una parte del mismo, iii) una composición que comprende un anticuerpo, ácido nucleico o célula descritos en la presente memoria o iv) un kit recombinante. célula descrita en la presente memoria, comprendida en  
55 un vial tal como un vial estéril u otro alojamiento y opcionalmente un agente de referencia y/o instrucciones para su uso.

Por ejemplo, el kit comprende además uno o más de un vial de recolección, un tampón convencional y un reactivo de detección.

60 Por ejemplo, el kit es para diagnosticar o controlar la enfermedad de Alzheimer o una afección que involucre Abeta oligomérico.

#### V. Métodos

65 La descripción también se refiere a métodos para producir los anticuerpos descritos en la presente memoria.

En particular, se describen métodos para preparar un anticuerpo descrito en la presente memoria selectivo para un epítipo conformacional de HHQK (Id. de sec. n.º: 7) usando un anticuerpo descrito en la presente memoria, comprendiendo el método administrar a un sujeto, opcionalmente un sujeto no humano, un compuesto cíclico que comprende una secuencia de epítipo descrita en la presente memoria, y aislamiento de células productoras de anticuerpos o anticuerpos que comprenden las CDR descritas en la presente memoria.

Por ejemplo, el método es para preparar un anticuerpo monoclonal usando, por ejemplo, un método como se describe en la presente memoria.

Por ejemplo, se describe un método para producir un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión del mismo, comprendiendo el método usar tecnología recombinante para subclonar un ácido nucleico que codifica la región variable de un anticuerpo (pesado y/o ligero) descrito en la presente memoria en un vector que comprende un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión del mismo. ácido que codifica un dominio constante de anticuerpo humano (por ejemplo, IgG1, 2, 3 ó 4), opcionalmente con o sin la porción Fc para producir un vector de anticuerpo quimérico; y expresar el vector de anticuerpo quimérico en una célula; y aislar el anticuerpo. En una realización, la quimera es una quimera humana de ratón.

Por ejemplo, el método es para producir un anticuerpo humanizado usando, por ejemplo, un método descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el método comprende preparar un intermedio quimérico. Las regiones variables del intermedio quimérico se mutagenizan, por ejemplo, para introducir uno o más cambios de aminoácidos fuera de las regiones CDR. Por ejemplo, una o más secuencias codificantes de CDR descritas en la presente memoria se insertan en una estructura de anticuerpo humano.

Los anticuerpos producidos usando un compuesto cíclico se seleccionan como se describe en la presente memoria y en los ejemplos tales. En una realización, el método comprende aislar anticuerpos que se unen específica o selectivamente al péptido cíclico sobre el péptido lineal, son específicos para la secuencia del epítipo, se unen específicamente al oligómero y/o carecen o se unen de manera insignificante a la placa in situ y/o al péptido lineal correspondiente, opcionalmente usando un método descrito en la presente memoria.

Se describe el uso del anticuerpo o inmunoconjugado para evaluar si una muestra biológica comprende A-beta, el método que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo descrito en la presente memoria y/o detectar la presencia de cualquier complejo de anticuerpo. En una realización, el método es para detectar si una muestra biológica comprende A-beta oligomérico.

Por ejemplo, el método comprende:

a. poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo descrito en la presente memoria que es específico y/o selectivo para el oligómero A-beta en la presente memoria en condiciones permisivas para producir un anticuerpo: complejo de oligómero A-beta; y

b. detectar la presencia de cualquier complejo;

en donde la presencia de complejo detectable es indicativa de que la muestra puede contener oligómero A-beta.

Por ejemplo, el nivel de complejo formado se compara con un anticuerpo de prueba tal como un control de Ig adecuado o un anticuerpo irrelevante.

Por ejemplo, se cuantifica la detección y se mide la cantidad de complejo producido. La medición puede ser, por ejemplo, relativa a un patrón.

Por ejemplo, la cantidad medida se compara con un control.

Por ejemplo, el método comprende:

(a) poner en contacto una muestra de prueba de dicho sujeto con un anticuerpo descrito en la presente memoria, en condiciones permisivas para producir un complejo anticuerpo-antígeno;

(b) medir la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba; y

(c) comparar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba con un control;

en donde la detección del complejo anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba en comparación con el control indica que la muestra comprende A-beta.

El control puede ser un control de muestra (por ejemplo, de un sujeto sin EA, o de un sujeto con una forma particular de EA, leve, moderada o avanzada), o ser una muestra previa del mismo sujeto para monitorear los cambios en el



oligómero A-beta. niveles en la materia. Alternativamente, el control puede ser un valor derivado de una pluralidad de pacientes con o sin EA.

Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR descritas en la presente memoria. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

Por ejemplo, la muestra es una muestra biológica. Preferiblemente, la muestra comprende tejido cerebral o un extracto del mismo y/o LCR. En una realización, la muestra comprende sangre completa, plasma o suero. Por ejemplo, la muestra se obtiene de un sujeto humano. En una realización, el sujeto es sospechoso de, está en riesgo de o tiene EA.

Se pueden usar varios métodos para detectar un complejo A-beta:anticuerpo y determinar así que los oligómeros A-beta están presentes en una muestra usando los anticuerpos descritos en la presente memoria, incluidos inmunoensayos tales como citometría de flujo, inmunotransferencias de tipo Western, ELISA, SPR e inmunoprecipitación seguida, mediante inmunocitoquímica SDS-PAGE.

Como se describe en los ejemplos, la tecnología de resonancia de plasmones superficiales se puede utilizar para evaluar la unión específica de conformación. Si el anticuerpo está marcado o se utiliza un anticuerpo secundario marcado de forma detectable y específico para el anticuerpo complejo, se puede detectar el marcador. Los reactivos comúnmente usados incluyen anticuerpos emisores de fluorescencia y anticuerpos marcados con HRP. En los métodos cuantitativos, la cantidad de señal producida se puede medir comparándola con un patrón o control. La medida también puede ser relativa.

Otro aspecto incluye el inmunoconjugado descrito en la presente memoria para su uso en la medición de un nivel de A-beta en un sujeto en riesgo o sospechoso de tener o padecer la enfermedad de Alzheimer, en donde el anticuerpo se conjuga con una etiqueta detectable, preferiblemente en donde la etiqueta es un radionucleido emisor de positrones, opcionalmente donde el A-beta que se va a medir o visualizar es A-beta oligomérico. Por ejemplo, el método comprende administrar a un sujeto en riesgo o que se sospecha que tiene o tiene EA, un anticuerpo descrito en la presente memoria conjugado con una etiqueta detectable; y detectar el marcador, opcionalmente detectar cuantitativamente el marcador. El marcador en una realización es un radionucleido emisor de positrones que puede usarse, por ejemplo, en imágenes PET.

Los métodos también pueden combinarse con otras pruebas de EA o deterioro cognitivo. Por ejemplo, los niveles de proteínas sinápticas, como SNAP-25 o la glicoproteína 2a de vesículas sinápticas (SVG2a) (Sci Transl Med. 20 de julio de 2016;8(348):348ra96. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6667) en el LCR se puede medir. Por ejemplo, la PET con fluorodesoxiglucosa (FDG-PET) se utiliza como medida indirecta del metabolismo sináptico.

La detección de niveles de A-beta usando un anticuerpo descrito en la presente memoria se puede utilizar solo o en combinación con otros métodos para controlar la respuesta al tratamiento.

En la presente memoria se demuestra que los anticuerpos generados contra ciclo(CGHHQKG) (Id. de sec. n.º 12), que comprenden los conjuntos de CDR descritos en la presente memoria, pueden unirse específica y/o selectivamente a oligómeros A-beta. Se cree que las especies oligoméricas A-beta son las especies tóxicas que se propagan en la EA. Además, como se muestra en la Figura 1 y descritos en los ejemplos, estos anticuerpos son específicos para oligómeros, inhiben la agregación A-beta y la propagación del oligómero A-beta. Por consiguiente, también se describen métodos de inhibición de la propagación de oligómeros de A-beta, el método comprende contactar una célula o tejido que expresa A-beta con o administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un anticuerpo específico o selectivo de oligómero de A-beta descrito en la presente memoria para inhibir la agregación de A-beta y/o la propagación de oligómeros. In vitro el ensayo puede controlarse como se describe en los ejemplos.

En un aspecto, los anticuerpos son para uso en el tratamiento de la EA y/u otras enfermedades relacionadas con el amiloide A-beta, en particular la demencia con cuerpos de Lewy y/o la angiopatía amiloide cerebral. Las variantes de la demencia con cuerpos de Lewy y la miositis por cuerpos de inclusión (una enfermedad muscular) exhiben placas similares a las de la EA y la A-beta también puede formar agregados implicados en la angiopatía amiloide cerebral. Como se mencionó, los anticuerpos que comprenden los conjuntos de CDR, así como las secuencias de anticuerpos humanizados descritas en la presente memoria, se unen a A-beta oligomérico que se cree que es una especie toxigénica de A-beta en la EA e inhiben la formación de oligómeros A-beta toxigénicos in vitro.

Se describe un anticuerpo o inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de la EA y/u otras enfermedades relacionadas con el amiloide A-beta, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en la presente memoria que comprende un conjunto de CDR descrito en la presente memoria, opcionalmente un anticuerpo humanizado, descrito en la tabla 4A o 4B o selectivo o una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo, a un sujeto que lo necesite. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos descritos en la presente memoria también se pueden administrar al sujeto, opcionalmente usando vectores adecuados para administrar ácidos nucleicos en un sujeto.

Según un aspecto de la invención, se proporciona una cantidad eficaz de un anticuerpo o inmunoconjugado según la invención, o una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo o inmunoconjugado, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la demencia con cuerpos de Lewy y/o la angiopatía amiloide cerebral

en un sujeto que lo necesita, preferiblemente en donde el anticuerpo o inmunoconjugado es para administración directamente al cerebro u otra porción del SNC. En una realización, se evalúa una muestra biológica del sujeto a tratar para determinar la presencia o niveles de A-beta usando un anticuerpo descrito en la presente memoria. En una realización, un sujeto con niveles detectables de A-beta (por ejemplo, complejos de anticuerpos A-beta medidos in vitro o medidos mediante imágenes) se trata con el anticuerpo.

El anticuerpo, los péptidos y los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos, por ejemplo, en una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria y formularse, por ejemplo, en vesículas para mejorar la administración.

Se pueden administrar en combinación uno o más anticuerpos dirigidos a HHQK (Id. de sec. n.º 7). Además, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden administrar con uno o más tratamientos diferentes, tales como un inhibidor de la beta-secretasa o un inhibidor de la colinesterasa.

También se proporcionan usos de las composiciones, anticuerpos, péptidos aislados y ácidos nucleicos para tratar enfermedades relacionadas con la EA o el amiloide A-beta.

Las composiciones, anticuerpos, péptidos y ácidos nucleicos aislados, vectores, etc. descritos en la presente memoria se pueden administrar, por ejemplo, por administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraventricular, intratecal, intraorbitaria, oftálmica, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol u oral.

Por ejemplo, la composición farmacéutica se administra sistémicamente.

Por ejemplo, la composición farmacéutica se administra directamente al cerebro u otra porción del SNC. Por ejemplo, dichos métodos incluyen el uso de un catéter implantable y una bomba, que servirían para descargar una dosis predeterminada a través del catéter hasta el lugar de infusión. Un experto en la técnica reconocería además que el catéter puede implantarse mediante técnicas quirúrgicas que permitan la visualización del catéter para colocar el catéter adyacente al sitio deseado de administración o infusión en el cerebro. Tales técnicas se describen en Elsberry y col. Patente estadounidense 5.814.014 "Techniques of Treating Neurodegenerative Disorders by Brain Infusion". También se contemplan métodos tales como los descritos en la solicitud de patente estadounidense 20060129126 (Kaplitt y During "Infusion Device and Method for Infusion Material into the Brain of a Patient". Están disponibles comercialmente dispositivos para administrar fármacos al cerebro y otras partes del SNC (por ejemplo, SynchroMed® EL Infusion System; Medtronic, Mineápolis, Minnesota).

Por ejemplo, la composición farmacéutica se administra al cerebro usando métodos tales como modificar los compuestos que se van a administrar para permitir el transporte mediado por receptores a través de la barrera hematoencefálica.

Otros ejemplos contemplan la coadministración de las composiciones, anticuerpos, péptidos aislados y ácidos nucleicos descritos en la presente memoria con moléculas biológicamente activas que se sabe que facilitan el transporte a través de la barrera hematoencefálica.

También se contemplan métodos para administrar las composiciones, anticuerpos, péptidos aislados y ácidos nucleicos descritos en la presente memoria a través de la barrera hematoencefálica, tales como aquellos dirigidos a aumentar transitoriamente la permeabilidad de la barrera hematoencefálica como se describe en la patente estadounidense 7012061 "Method for increasing the permeability of the blood brain barrier".

La descripción anterior describe en general la presente solicitud. Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la solicitud. Se contemplan cambios de forma y sustitución de equivalentes según las circunstancias lo sugieran o lo hagan oportuno. Aunque en la presente descripción se han empleado términos específicos, dichos términos están pensados en un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente descripción:

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Generación de anticuerpos

Métodos y materiales

Inmunógeno

El péptido ciclo(CGHHQKG) (Id. de sec. n.º:12) se generó en CPC Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU. (tanto cíclico como lineal) y se conjugó con KLH (para inmunización) y BSA (para detección) usando un protocolo de contraíón de trifluoroacetato. También se preparó un péptido lineal de las mismas secuencias, CGHHQKG (Id. de sec. n.º: 12).

## Anticuerpos

- 5 Se generaron hibridomas y anticuerpos monoclonales contra ciclo(CGHHQKG) (Id. de sec. n.º: 12) unido a hemocianina de lapa californiana (KLH).

## Fusión 1 Desarrollo de hibridomas

- 10 Los linfocitos se aislaron y fusionaron con células de mieloma SP2/0 murino en presencia de polietilenglicol (PEG 1500). Las células fusionadas se cultivaron mediante selección HAT. T.

## Análisis de hibridoma

- 15 Los sobrenadantes de cultivos de tejidos de los hibridomas se analizaron mediante ELISA indirecto en el antígeno de detección (péptido cíclico-BSA) y se sondaron para detectar anticuerpos tanto IgG como IgM usando un anti-IgG/IgM(H&L)-HRP de cabra secundario y se revelaron con sustrato TMB. Los cultivos positivos se volvieron a analizar con un antígeno de detección para confirmar la secreción y con un antígeno irrelevante (transferrina humana) para eliminar los AcM no específicos y descartar falsos positivos. Los clones seleccionados se isotiparon mediante ELISA de captura de anticuerpos para determinar si son isotipo IgG o IgM. Los clones seleccionados también se probaron mediante ELISA indirecto en otros conjugados de péptido cíclico-BSA así como conjugados de péptido lineal-BSA para evaluar la reactividad cruzada y la reactividad del ligador. Los anticuerpos también se seleccionaron mediante análisis SPR.

## Detección de anticuerpos ELISA

- 25 Las placas ELISA se recubrieron con 1) BSA conjugado con ciclopéptido 0,1ug/pocillo a 100uL/pocillo en tampón de recubrimiento de carbonato (pH 9,6) O/N a 4C; 2) 0,1 ug/pocillo de BSA conjugado con péptido lineal a 100 ul/pocillo en tampón de recubrimiento de carbonato (pH 9,6) O/N a 4C; o 3) 0,1 ug/pocillo de péptido negativo a 100 ul/pocillo en tampón de recubrimiento de carbonato (pH 9,6) O/N a 4C. Anticuerpo primario: El sobrenadante de hibridoma a 100 ul/pocillo se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Anticuerpo secundario 1:10.000 anticuerpo de cabra anti-IgG/IgM(H+L)-HRP de ratón a 100 µl/pocillo en PBS-Tween durante 1 hora a 37 °C con agitación. Todas las etapas de lavado se realizaron durante 30 minutos con PBS-Tween. El sustrato TMB se añadió a 50 ul/pocillo, se reveló en la oscuridad y se detuvo con un volumen igual de HCl 1 M.

## Ensayos de unión de SPR

- 35 Análisis SPR de unión de anticuerpos a péptidos cíclicos, monómeros y oligómeros A-beta

## Preparación de monómero y oligómero A-beta:

- 40 Los péptidos recombinantes A-beta40 y 42 (California Peptide, Salt Lake City UT, EE. UU.) se disolvieron en hexafluoroisopropanol (HFIP) helado. El HFIP se eliminó por evaporación durante la noche y se secó en una centrífuga SpeedVac. Para preparar monómeros, la película peptídica se reconstituyó en DMSO hasta 5 mM, se diluyó aún más hasta 100 µM en dH2O y se usó inmediatamente. Los oligómeros se prepararon diluyendo la solución de péptido DMSO 5 mM en medio F12 sin rojo fenol (Life Technologies Inc., Burlington ON, Canadá) hasta una concentración final de 100 µM y se incubaron durante 24 horas a 7 días a 4 °C.

## Análisis SPR de unión de péptidos cíclicos, monómeros A-beta y oligómeros:

- 50 Todas las mediciones de SPR se realizaron usando un sistema de detección de afinidad molecular (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburgo, Alemania), un biosensor analítico que emplea luz láser de alta intensidad y escaneo óptico de alta velocidad para monitorear las interacciones de unión en tiempo real. La selección primaria de sobrenadantes de cultivos de tejidos se realizó usando un ensayo de unión directa SPR, mediante el cual los péptidos conjugados con BSA, el monómero A-beta42 y el oligómero A-beta42 se inmovilizan covalentemente en celdas de flujo individuales de un chip sensor de alta capacidad de amina (HAC) (Sierra Sensors GmbH, Hamburgo, Alemania) y los anticuerpos fluyeron por la superficie. Cada muestra se diluyó y se inyectó por duplicado sobre el péptido inmovilizado y las superficies de referencia de BSA, seguido de la inyección de tampón de ejecución solo para la fase de disociación. Después de cada ciclo analítico, se regeneraron las superficies del chip sensor. Los sensorgramas se hicieron referencia doble restando la unión de las superficies de referencia de BSA y las inyecciones de tampón en ejecución en blanco, y los puntos de informe de respuesta de unión recopilados en la fase de disociación.

- 60 Los AcM purificados con proteína G se analizaron en una selección secundaria usando un ensayo de unión indirecta (captura) de SPR, mediante el cual los anticuerpos se inmovilizaron en un chip sensor derivatizado con proteína A (XanTec Bioanalytics GmbH, Duesseldorf, Alemania) y monómero A-beta40, A-beta42. Oligómeros, extractos de cerebro solubles agrupados fluían sobre la superficie. La especificidad de los anticuerpos se verificó en un ensayo de unión directa de SPR inmovilizando covalentemente el monómero A-beta42 y el oligómero A-beta42 en celdas de flujo individuales de un chip sensor HAC y haciendo fluir AcM purificados sobre la superficie.

## Secuenciación de anticuerpos

5 Se secuenciaron las CDR y las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. Las transcripciones del gen de inmunoglobulina expresadas por los hibridomas se amplificaron a partir del ADNc generado a partir de las células del hibridoma usando RT-PCR convencional y se secuenciaron usando un método de secuenciación capilar con terminador de colorante convencional.

## Anticuerpos humanizados

10 Se prepararon constructos de anticuerpos IgG4 humanizados para 301-17 y se secuenciaron (Abzena Cambridge, Reino Unido).

15 Brevemente, se extrajo ARN del sedimento de células del hibridoma 301-17 usando un mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Las regiones V se amplificaron mediante RT-PCR usando grupos de cebadores degenerados para secuencias señal de anticuerpos murinos junto con cebadores de regiones constantes para cada una de IgG e Igk. El ARNm de la región V de la cadena pesada se amplificó utilizando un conjunto de seis grupos de cebadores degenerados (A a F) específicos para secuencias señal VH junto con cebadores de la región constante específicos de IgG. El ARNm de la región V de la cadena ligera se amplificó usando un conjunto de ocho grupos de cebadores degenerados específicos de la secuencia señal, siete para la agrupación kappa (Igk-A a Igk-G) y uno para el clúster lambda (IgA), junto con cebadores de la región constante  $\kappa$  o A. Los productos de la PCR obtenidos se purificaron, se clonaron en un vector de clonación 'TA' (pGEM-T Easy, Promega, Madison, EE. UU.), se transformaron en *E. coli* y colonias individuales secuenciadas.

25 Se prepararon constructos quiméricos (V0H0 y V0k0) usando las regiones variables del hibridoma que se clonaron en una estructura de IgG4 humana. Luego se humanizaron los constructos quiméricos para crear 6 cadenas pesadas humanizadas (VH1-6) y 6 cadenas ligeras (Vk1-6). Se mezclaron constructos VH1-6 y Vk4-6 para crear diferentes anticuerpos humanizados, por ejemplo VH2Vk4.

30 La variante de bisagra S241P comprende una disposición de enlaces disulfuro alterada de una molécula de IgG4 mediante la mutación de Cys en el extremo N del dominio constante 1 de la cadena pesada (C<sub>H</sub>1) (posición 127 de Kabat) a una Ser y la introducción de una Cys en una variedad de posiciones (posiciones 227-230) en el extremo C de C<sub>H</sub>1. Se forma un enlace disulfuro inter-LC-C<sub>H</sub>1 [17].

35 Los anticuerpos completamente humanizados se prepararon usando la tecnología Composite Human Antibody™. Los genes de la región variable humanizada se clonaron en vectores que codifican un dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana (variante de bisagra S241P) y un dominio constante de cadena ligera kappa humana. Los anticuerpos quiméricos y humanizados se expresaron transitoriamente en células CHO y la proteína A se purificó y analizó. Todos los anticuerpos humanizados 301-17 se unieron selectivamente al péptido cíclico conjugado con BSA con afinidades de unión dentro de 2 veces del anticuerpo quimérico de referencia y más de 10 veces y aproximadamente 20 veces del anticuerpo monoclonal de referencia. Los anticuerpos quiméricos y humanizados tenían una KD (M) de aproximadamente  $2 \times 10^{-11}$  mientras que la KD del anticuerpo monoclonal tenía una KD (M) de  $4 \times 10^{-10}$  para el péptido cíclico. Como se muestra en la Figura 2, esto se traduce en una afinidad mejorada por Abeta oligomérico.

45 La unión se determinó mediante análisis Biacore de ciclo único. Los anticuerpos se analizaron en dos experimentos separados.

50 Las secuencias de anticuerpos humanizados se proporcionan en la tabla 4B (301-17). Las secuencias CDR de cada secuencia de anticuerpo están en negrita y subrayadas. Las CDR de 301-11 o cualquier otro anticuerpo descrito en la presente memoria se pueden usar para reemplazar las CDR en las construcciones humanizadas como se muestra, por ejemplo, en la tabla 4A.

## Resultados

55 Las pruebas ELISA encontraron que los clones de hibridoma se unían al ciclopéptido preferentemente sobre el péptido lineal. Se seleccionaron los clones 301-3, 301-11 y 301-17 generados contra ciclo(CGHHQKG) para análisis adicionales.

El isotipo reveló que 301-3, 301-11 y 301-17 eran subtipos de IgG3.

60 Los anticuerpos se probaron en uno o más ensayos para determinar su capacidad para unirse a péptidos cíclicos, péptidos lineales, monómeros A-beta 1-42 y oligómeros A-beta 1-42 preparados como se describió anteriormente.

65 Los ensayos ELISA y SPR confirmaron que los clones se unían preferiblemente al ciclopéptido con respecto al péptido lineal (y no presentaban reactividad cruzada con péptidos cíclicos no relacionados) y/o se unían preferentemente a oligómeros de A $\beta$  con respecto a los monómeros. Los resultados del análisis de unión usando SPR con sobrenadantes de cultivo de hibridoma se muestran en la tabla 1A.

Los anticuerpos purificados a partir de los sobrenadantes del hibridoma se inmovilizaron y se analizó su capacidad para unirse a oligómeros de Abeta mediante SPR. Los resultados se muestran en la tabla 1B.

Tabla 1A

	Péptido cíclico (RU)	Péptido lineal (RU)	Monómero Ab42 (RU)	Oligómero Ab42 (RU)
301-11	488	210,5	21,6	75,3
301-3	468,9	60,6	-1,8	56,8

Tabla 1B

	Monómero Ab42 (RU)	Oligómero Ab42 (RU)
301-3	-23,8	15,5
301-11	-14,1	-2,8
301-17	-27,1	147,8

#### Secuencia de anticuerpos

Se secuenciaron los anticuerpos de los clones 301-3, 301-11 y 301-17. Las secuencias de CDR de 301-3 y 301-11 se proporcionan en la tabla 2. Las CDR para 301-17 se proporcionan en las Id. de sec. n.º 74-79. La secuencia consenso de ADN y las secuencias polipeptídicas de la porción variable de cadena pesada y ligera de los anticuerpos se proporcionan en la tabla 3.

Como se muestra en la tabla 2, las CDR de cadena pesada para 301-3 y 301-11 fueron idénticas para las CDR 1 y 2 y la CDR3 varió en una posición.

Se secuenciaron dos cadenas ligeras. Una cadena ligera era casi idéntica a la cadena ligera para 301-11.

Se prepararon anticuerpos humanizados para 301-17 y se secuenciaron (Abzena Cambridge UK). Las secuencias de anticuerpos humanizados se proporcionan en las tablas 4A (301-11) y 4B (301-17). Las secuencias CDR de cada secuencia de anticuerpo están en negrita y subrayadas.

Tabla 2

Anticuerpo	Cadena	CDR	Secuencia	Id. de sec. n.º.
301-11	Pesada	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-11		CDR-H2	ISDGGSYT	2
301-11		CDR-H3	ARDYYGSSSYTSGFAY	3
301-11	Ligera	CDR-L1	QSLNLSRTRKNY	4
301-11		CDR-L2	WAS	5
301-11		CDR-L3	KQSYNLYT	6
301-03-1	Pesada	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-03-1		CDR-H2	ISDGGSYT	2
301-03-1		CDR-H3	ARDYYGSNSYTSFGFAY	80
301-03-1	Ligera	CDR-L1	QSLNLSRTRKNY	4
301-03-1		CDR-L2	WAS	5
301-03-1		CDR-L3	KQSYNLYT	6
301-03-2	Pesada	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-03-2		CDR-H2	ISDGGSYT	2
301-03-2		CDR-H3	ARDYYGSNSYTSFGFAY	80

301-03-2	Ligera	CDR-L1	QSIVHSNGNTY	81
301-03-2		CDR-L2	KVS	82
301-03-2		CDR-L3	FQGSHPVLT	83
301-17	Pesada	<u>CDR-H1</u>	<u>GYSFTSYW</u>	74
301-17		CDR-H2	VHPGRGVST	75
301-17		CDR-H3	SRSHGNTYWFFDV	76
301-17	Ligera	CDR-L1	QSIVHSNGNTY	77
301-17		CDR-L2	KVS	78
301-17		CDR-L3	FQGSHPVPT	79

Tabla 3

Secuencia de ADN de consenso y secuencias de proteínas traducidas de la región variable. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas según IMTG/LIGM-DB.		
Anticuerpo e isotipo	Secuencia de ADNc de consenso	Secuencia polipeptídica
301-11 IgG3 Id. de sec. n.º: 8, 9	ATGAACCTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGCTCCTGTTTAAAA GGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTA GTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCT <b>GGA</b> <b>TTCACTTTTCAGTGACTATTAC</b> ATGTATTGGGTTCCGCCAGACTC CGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTGCAACC <b>ATTAGTGATGGTGG</b> <b>TAGTTACACCT</b> CCTATCCAGACAGTGTGAAGGGACGATTACCA TCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCA GTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGT <b>GCAAGAGAT</b> <b>TACTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTACTG</b> GGGCCAAGGGAAGTCTGGTCACTGTCTCTGCA	MNFGSLIFLVVLVKG VQCEVQLVESGGGLVK PGGSLKLSCAAS <b>GFTF</b> <b>SDYY</b> MYWVRQTPEKRL EWWAT <b>ISDGGSYT</b> SY PDSVKGRFTISRDNK NNLYLQMSLSRSEDTA MYYC <b>ARDYYGSSSYT</b> <b>SGFAY</b> WGQGLVTVSA
301-11 Kappa Id. de sec. n.º: 10, 11	ATGGATTACAGGCCCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTATGGGTA TCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCC CTGGCTGTGTCAACAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCC AGT <b>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACT</b> TT GGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGAT CTAC <b>TGGGCATCC</b> ACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCA CAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTG TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGC <b>AAGCAATCTTAT</b> <b>AATCTGTACACG</b> TTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	MDSQAQVLILLLLWVS GTCGDIVMSQSPSSLA VSTGEKVTMSCKSS <b>QS</b> <b>LLNSRTRKNY</b> LAWYQ QKPGQSPKLLIY <b>WAST</b> RESGVPDRFTGSGSGT DFTLTISSVQAEDLAV YYC <b>KQSYNLYT</b> FGGG TKLEIK
301-03 IgG3 Id. de sec. n.º: 84, 85	ATGAACCTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGCTCCTGTTTAAAA GGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTA GTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCT <b>GGA</b> <b>TTCACTTTTCAGTGACTATTAC</b> ATGTATTGGGTTCCGCCAGACTC CGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTGCAACC <b>ATTAGTGATGGTGG</b> <b>TAGTTACACCT</b> CCTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCA TCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCA GTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGT <b>GCAAGAGAT</b> <b>TACTACGGTAGTAATAGTTACACCTCGGGCTTTGCTTACTG</b> GGGCCAAGGGAAGTCTGGTCACTGTCTCTGCA	MNFGSLIFLVVLVKG VQCEVQLVESGGGLVK PGGSLKLSCAAS <b>GFTF</b> <b>SDYY</b> MYWVRQTPEKRL EWWAT <b>ISDGGSYT</b> SY PDSVKGRFTISRDSA NNLYLQMSLSKSEDTA MYYC <b>ARDYYGSNSYT</b> <b>SGFAY</b> WGQGLVTVSA
301-03 Kappa 1 Id. de sec. n.º: 86, 87	ATGGATTACAGGCCCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTATGGGTA TCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCC CTGGCTGTGTCAAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCC AGT <b>CAGAGTCTGCTCAATAGTAGAACCCGAAAGAACTACT</b> TT GGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGAT CTAC <b>TGGGCATCC</b> ACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCA CAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTG TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGC <b>AAGCAATCTTAT</b> <b>AATCTGTACACG</b> TTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	MDSQAQVLILLLLWVS GTCGDIVMSQSPSSLA VSAGEKVTMSCKSS <b>QS</b> <b>LLNSRTRKNY</b> LAWYQ QKPGQSPKLLIY <b>WAST</b> RESGVPDRFTGSGSGT DFTLTISSVQAEDLAV YYC <b>KQSYNLYT</b> FGGG TKLEIK

5	301-03 Kappa 2 Id. de sec. n.º: 88, 89	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCT GCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTG CCTGTCACTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTAC CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTT <u>TCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT</u> CAGTGGCAGTGGA TCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAG GATCTGGGAGTTTATTCTGCTTTCAAGGTTCAACATGTTCTCTCTC <u>ACGTT</u> TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	MKLPVRLVLVLMFWIPA SSSDVLMQTPLSLPV SLGDQASISCRSSQSI <u>VHSNGNTY</u> LEWYLQKP GQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDF LKISRVEAEDLGVYFC <u>FQGSHPVPLT</u> FGAGTKL ELK
10	301-17 IgG3 Id. de sec. n.º: 96, 97	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTTTGGTAGCAACAGCTACA GGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTT GTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAAATGTCTGCAAGGCTTCTGGC <u>TACAGCTTACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT GGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGATGTTTCATCCTGGTAGAGGT <u>GTTTCTACCT</u> TACAATGCGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACT CTAGACACGTCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTG ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATGTTCAAGATCCCACGGT <u>AATACCTACTGGTTCTTCCGATGCT</u> TGGGGCGCAGGGACACGGTC ACCGTCTCTCAGCTACAACAACAGCCCCATCT	MGWSCIIILFLVATATG VHSQVQLQPGAEVLK PGASVKMSCKASGYSF <u>TSYWIN</u> VWKQRPQGGL EWIGDVHPGRGVSTYN AKFKSKATLTLDTS TAYMQLSSLTSEDSAV YYCSRSRGNTYWFDDV WGAGTTVTVSSATTTA PS
20	301-17 Kappa Id. de sec. n.º: 98, 99	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCT GCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTG CCTGTCACTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTAC CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTT <u>TCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT</u> CAGTGGCAGTGGA TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAG GATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCAACATGTTCCATT <u>ACGTT</u> TCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACGGGCTGATGCT	MKLPVRLVLVLMFWIPA SSSDVLMQTPLSLPV SLGDQASISCRSSQSI <u>VHSNGNTY</u> LEWYLQKP GQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDF LKISRVEAEDLGVYFC <u>FQGSHPVPLT</u> FGAGTKL EIKRADA

Tabla 4A

	Anticuerpo quimérico/humanizado 301-11
35	VH0* Id. de sec. n.º: 13, 14
	VH1 Id. de sec. n.º: 15, 16
	VH2 Id. de sec. n.º: 17, 18
40	VH3 Id. de sec. n.º: 19, 20
	VH4 Id. de sec. n.º: 21, 22
	VH5 Id. de sec. n.º: 23, 24
	VH6 Id. de sec. n.º: 25, 26
45	VK0* Id. de sec. n.º: 27, 28
	VK1 Id. de sec. n.º: 29, 30
	VK2 Id. de sec. n.º: 31, 32
50	VK3 Id. de sec. n.º: 33, 34
	VK4 Id. de sec. n.º: 35, 36
	VK5 Id. de sec. n.º: 37, 38
55	VK6 Id. de sec. n.º: 39, 40

Tabla 4B

60	Humanizado = Anticuerpo	Secuencia de ADNc	Secuencia polipeptídica
----	----------------------------	-------------------	-------------------------

5	301-17 VH0* Id. de sec. n.º: 41,42	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT <b><u>GGCTACAGCTTCACC</u></b> <b><u>AGCTACTGG</u></b> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTT GAGTGGATTGGAGAT <b><u>GTGCATCCTGGTAGAGGCGTGTCCACA</u></b> TAC AATGCTAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTCTGGACACATCC TCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC TCTGCGGTCTATTACTGT <b><u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGG</u></b> <b><u>TTTTTTGACGTC</u></b> TGGGGCCAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLQQPGAELVKPGA SVKMSCKAS <b><u>GYSFTSY</u></b> <b><u>WIN</u></b> WVKQRPQGLEWI GD <b><u>VHPGRGVST</u></b> YNAKF KSKATLTLDTSSTAY MQLSSLTSSEDSAVYYC <b><u>SRSHGNTYWFFD</u></b> VWGA GTTVTVSS
10	VH1 Id. de sec. n.º: 43, 44	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTTAAGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT <b><u>GGCTACAGCTTCACC</u></b> <b><u>AGCTACTGG</u></b> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTT GAGTGGATTGGAGAT <b><u>GTGCATCCTGGTAGAGGCGTGTCCACA</u></b> TAC AATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCCACACTGACTCTGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC TCTGCGGTCTATTACTGT <b><u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGG</u></b> <b><u>TTTTTTGACGTC</u></b> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAELKKPGA SVKMSCKAS <b><u>GYSFTSY</u></b> <b><u>WIN</u></b> WVKQRPQGLEWI GD <b><u>VHPGRGVST</u></b> YNAKF KSRATLTLDTSISTAY MQLSSLTSSEDSAVYYC <b><u>SRSHGNTYWFFD</u></b> VWGO GTTVTVSS
15	VH2 Id. de sec. n.º: 45, 46	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT <b><u>GGCTACAGCTTCACC</u></b> <b><u>AGCTACTGG</u></b> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTT GAGTGGATTGGAGAT <b><u>GTGCATCCTGGTAGAGGCGTGTCCACA</u></b> TAC AATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCCACACTGACTCTGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACGGCGGTCTATTACTGT <b><u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGG</u></b> <b><u>TTTTTTGACGTC</u></b> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKMSCKAS <b><u>GYSFTSY</u></b> <b><u>WIN</u></b> WVKQRPQGLEWI GD <b><u>VHPGRGVST</u></b> YNAKF KSRATLTLDTSISTAY MELSSLRSEDTAVYYC <b><u>SRSHGNTYWFFD</u></b> VWGO GTTVTVES
20	VH3 Id. de sec. n.º: 47, 48	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <b><u>GGCTACAGCTTCACC</u></b> <b><u>AGCTACTGG</u></b> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTT GAGTGGATTGGAGAT <b><u>GTGCATCCTGGTAGAGGCGTGTCCACA</u></b> TAC AATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCTCACACTGACTCTGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACGGCGGTCTATTACTGT <b><u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGG</u></b> <b><u>TTTTTTGACGTC</u></b> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKMSCKAS <b><u>GYSFTSY</u></b> <b><u>WIN</u></b> WVRQRPQGLEWI GD <b><u>VHPGRGVST</u></b> YNAKF KSRATLTLDTSISTAY MELSSLRSEDTAVYYC <b><u>SRSHGNTYWFFD</u></b> VWGO GTTVTVSS
25	VH4 Id. de sec. n.º: 49, 50	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <b><u>GGCTACAGCTTCACC</u></b> <b><u>AGCTACTGG</u></b> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTT GAGTGGATTGGAGAT <b><u>GTGCATCCTGGTAGAGGCGTGTCCACA</u></b> TAC AATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGTCAACTGACTCTGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACGGCGGTCTATTACTGT <b><u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGG</u></b> <b><u>TTTTTTGACGTC</u></b> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKMSCKAS <b><u>GYSFTSY</u></b> <b><u>WIN</u></b> WVRQRPQGLEWI GD <b><u>VHPGRGVST</u></b> YNAKF KSRVTLTLDTSISTAY MELSSLRSEDTAVYYC <b><u>SRSHGNTYWFFD</u></b> VWGO GTTVTVSS
30	VH5 Id. de sec. n.º: 51, 52	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <b><u>GGCTACAGCTTCACC</u></b> <b><u>AGCTACTGG</u></b> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTT GAGTGGATTGGAGAT <b><u>GTGCATCCTGGTAGAGGCGTGTCCACA</u></b> TAC AATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGTCAACTGACTAGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACGGCGGTCTATTACTGT <b><u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGG</u></b> <b><u>TTTTTTGACGTC</u></b> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKMSCKAS <b><u>GYSFTSY</u></b> <b><u>WIN</u></b> WVRQRPQGLEWI GD <b><u>VHPGRGVST</u></b> YNAKF KSRVTLTLDTSISTAY MELSSLRSEDTAVYYC <b><u>SRSHGNTYWFFD</u></b> VWGO GTTVTVES
35	VH6 Id. de sec. n.º:	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <b><u>GGCTACAGCTTCACC</u></b> <b><u>AGCTACTGG</u></b> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTT	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKMSCKAS <b><u>GYSFTSY</u></b> <b><u>WIN</u></b> WVRQRPQGLEWI
40	53, 54	GAGTGGATTGGAGAT <b><u>GTGCATCCTGGTAGAGGCGTGTCCACA</u></b> TAC AATGCTAAGTTCCAGGGCAGAGTCAATGACTAGGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACGGCGGTCTATTACTGT <b><u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGG</u></b> <b><u>TTTTTTGACGTC</u></b> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	GD <b><u>VHPGRGVST</u></b> YNAKF QGRVTMTDRDTSISTAY MELSSLRSEDTAVYYC <b><u>SRSHGNTYWFFD</u></b> VWGO GTTVTVSS
45	VK0* Id. de sec. n.º: 55, 56	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTT GGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGT <b><u>CAGAGCATTTGTA</u></b> <b><u>CATAGTAATGGAACACCTAT</u></b> TTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCA GGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTAC <b><u>AAAGTTTTCC</u></b> AACCGATT TCTGGGGTCCAGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTT TATTACTGCT <b><u>TTTCAAGGTTACATGTTCCCTTTCACT</u></b> TTTGGCAGC GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVLMTQTPLSLPVS LG DQASISCRSS <b><u>QSIVHS</u></b> <b><u>NGNTY</u></b> LEWYLQKPGQS PKLLIY <b><u>KVSN</u></b> RFRSGVP DRFSGSGSDFTLKI SRVEADLGVIY <b><u>CFQG</u></b> <b><u>SHVPEFT</u></b> FGSGTKLEIK



5	VK1 Id. de sec. n.º: 57, 58	GATGTTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTT GGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <b><u>CAGAGCATTGTA</u></b> <b><u>CATAGTAATGGAAACACCTAT</u></b> TTAGAATGGTTTCAGCAGAAACCA GGCCAGTCTCCAAGGCGCTGATCTAC <b><u>AAAGTTTCC</u></b> AACCGATTT TCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTT TATTACTGCT <b><u>TTTCAAGGTTTCACATGTTTCCTTTCACT</u></b> TTTGGCCAA GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVLMTQSPLSLPVTLG QPASISCRSS <b><u>QSIVHS</u></b> <b><u>NGNTY</u></b> LEWFQQKPGQS PRRLIY <b><u>KVS</u></b> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYC <b><u>FOG</u></b> <b><u>SHVPFT</u></b> FGQGTKLEIK
10	VK2 Id. de sec. n.º: 59, 60	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTT GGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <b><u>CAGAGCATTGTA</u></b> <b><u>CATAGTAATGGAAACACCTAT</u></b> TTAGAATGGTTTCAGCAGAAACCA GGCCAGTCTCCAAGGCGCTGATCTAC <b><u>AAAGTTTCC</u></b> AACCGATTT TCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTT TATTACTGCT <b><u>TTTCAAGGTTTCACATGTTTCCTTTCACT</u></b> TTTGGCCAA GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVVMTQSPLSLPVTLG QPASISCRSS <b><u>QSIVHS</u></b> <b><u>NGNTY</u></b> LEWFQQKPGQS PRRLIY <b><u>KVS</u></b> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYC <b><u>FOG</u></b> <b><u>SHVPFT</u></b> FGQGTKLEIK
15	VK3 Id. de sec. n.º: 61,62	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTT GGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <b><u>CAGAGCATTGTA</u></b> <b><u>CATAGTAATGGAAACACCTAT</u></b> TTAGAATGGTTTCAGCAGAGGCCA GGCCAGTCTCCAAGGCGCTGATCTAC <b><u>AAAGTTTCC</u></b> AACCGATTT TCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTT TATTACTGCT <b><u>TTTCAAGGTTTCACATGTTTCCTTTCACT</u></b> TTTGGCCAA GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVVMTQSPLSLPVTLG QPASISCRSS <b><u>QSIVHS</u></b> <b><u>NGNTY</u></b> LEWFQQKPGQS PRRLIY <b><u>KVS</u></b> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYC <b><u>FOG</u></b> <b><u>SHVPFT</u></b> FGQGTKLEIK
20	VK4 Id. de sec. n.º: 63, 64	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTT GGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <b><u>CAGAGCATTGTA</u></b> <b><u>CATAGTAATGGAAACACCTAT</u></b> TTAGAATGGTACCTGCAGAGGCCA GGCCAGTCTCCAAGGCTGCTGATCTAC <b><u>AAAGTTTCC</u></b> AACCGATTT TCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTT TATTACTGCT <b><u>TTTCAAGGTTTCACATGTTTCCTTTCACT</u></b> TTTGGCCAA GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVLMTQSPLSLPVTLG QPASISCRSS <b><u>QSIVHS</u></b> <b><u>NGNTY</u></b> LEWYLQRPQGS PKLLIY <b><u>KVS</u></b> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYC <b><u>FOG</u></b> <b><u>SHVPFT</u></b> FGQGTKLEIK
25	VK5 Id. de sec. n.º: 65, 66	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTT GGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <b><u>CAGAGCATTGTA</u></b> <b><u>CATAGTAATGGAAACACCTAT</u></b> TTAGAATGGTACCAGCAGAGGCCA GGCCAGTCTCCAAGGCTGCTGATCTAC <b><u>AAAGTTTCC</u></b> AACCGATTT TCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTT TATTACTGCT <b><u>TTTCAAGGTTTCACATGTTTCCTTTCACT</u></b> TTTGGCCAA GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVLMTQSPLSLPVTLG QPASISCRSS <b><u>QSIVHS</u></b> <b><u>NGNTY</u></b> LEWYQQRPGQS PRLLIY <b><u>KVS</u></b> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYC <b><u>FOG</u></b> <b><u>SHVPFT</u></b> FGQGTKLEIK
30	VK6 Id. de sec. n.º: 67, 68	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTT GGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <b><u>CAGAGCATTGTA</u></b> <b><u>CATAGTAATGGAAACACCTAT</u></b> TTAGAATGGTACCAGCAGAGGCCA GGCCAGTCTCCAAGGCTGCTGATCTAC <b><u>AAAGTTTCC</u></b> AACCGATTT TCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTT TATTACTGCT <b><u>TTTCAAGGTTTCACATGTTTCCTTTCACT</u></b> TTTGGCCAA GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVVMTQSPLSLPVTLG QPASISCRSS <b><u>QSIVHS</u></b> <b><u>NGNTY</u></b> LEWYQQRPGQS PRLLIY <b><u>KVS</u></b> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYC <b><u>FOG</u></b> <b><u>SHVPFT</u></b> FGQGTKLEIK
35		TATTACTGCT <b><u>TTTCAAGGTTTCACATGTTTCCTTTCACT</u></b> TTTGGCCAA GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	SRVEAEDVGYYC <b><u>FOG</u></b> <b><u>SHVPFT</u></b> FGQGTKLEIK
40	*VH0 y VK0 denotan anticuerpos quiméricos compuestos por secuencias del dominio constante humano y del dominio variable de ratón.		

Tabla 5 Secuencia del anticuerpo humanizado IgG4

Regiones constantes	Secuencia de ADNc	Secuencia polipeptídica
---------------------	-------------------	-------------------------

<p>Cadena pesada de IgG4 Id. de sec. n.º: 69, 70</p>	<p>GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCC AGGAGCACCTCCGAGAGCAGACCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCC CTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCTCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA TGCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGACCATCAGTC TTCTGTTCCTCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGAC CCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGCGGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCTTACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAAC GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAAGGCTCCCGTCC TCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAAAC TACAAGACCACGCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTC CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGG AATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGTAAATGA</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGKTK YTCNVDHKKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVTV DVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYCKVSNKGL PSSIEKTIISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSD LAVEWESNQGPFENYK TTPFVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK</p>
<p><b>Kappa</b> Id. de sec. n.º: 71, 72</p>	<p>CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCTTCCCCCATCTGAT GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTGTGTGCTGCTGAAT AACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCTGAGCTCGCCGCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGTTAG</p>	<p>RTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCCLNMF YPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYE KHVKYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>

## Ejemplo 2

### Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó en secciones de cerebro humano congeladas, sin fijación ni recuperación de antígenos. En una cámara humidificada, la tinción no específica se bloqueó mediante incubación con reactivo bloqueador de proteínas sin suero (Dako Canada Inc., Mississauga, ON, Canadá) durante 1 h. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios para la inmunotinción: controles de isotipo monoclonal de ratón IgG1, IgG2a e IgG2b, y anti-amiloideβ 6E10, todos adquiridos de Biolegend, y anticuerpos purificados 301-11 y 301-17. Todos los anticuerpos se usaron a 1 µg/ml. Las secciones se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h y se lavaron 3 x 5 min en TBS-T. Se aplicó anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:1000) a las secciones y se incubó durante 45 minutos, luego se lavó 3 x 5 minutos en TBS-T. Se aplicó el reactivo cromógeno DAB (Vector Laboratories, Burlington ON, Canadá) y las secciones se enjuagaron con agua destilada cuando se alcanzó el nivel deseado de tinción objetivo a fondo. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y se aplicaron cubreobjetos. Los portaobjetos se examinaron con un microscopio óptico (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss Canada, Toronto ON, Canadá) y se capturaron imágenes representativas con un aumento de 20 y 40X utilizando una cámara digital y un software Leica DC300 (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, ON). Las imágenes se optimizaron en Adobe Photoshop usando la corrección automática de niveles.

### Extractos de cerebro

Los tejidos cerebrales humanos se obtuvieron del Banco de Tejidos y Cerebros de la Universidad de Maryland tras la aprobación de la Junta de Ética de Investigación Clínica de la UBC (C04-0595). El diagnóstico clínico de probable EA se basó en los criterios NINCDS-ADRDA [5].

**Homogeneización:** Se pesaron muestras de tejido cerebral humano y posteriormente se sumergieron en un volumen de TBS fresco helado y cóctel de inhibidor de proteasa sin EDTA de Roche Diagnostics (Laval QC, Canadá) de tal modo que la concentración final de tejido cerebral fuera del 20 % (p/v). El tejido se homogeneizó en este tampón usando un homogeneizador de sonda mecánica (pulsos de 3 x 30 segundos con pausas de 30 segundos entre ellos, todos realizados en hielo). Luego, las muestras homogeneizadas con TBS se sometieron a ultracentrifugación (70.000 xg durante 90 min). Los sobrenadantes se recogieron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C. La concentración de proteína de los homogeneizados de TBS se determinó mediante un ensayo de proteína BCA (Pierce Biotechnology Inc, Rockford IL, EE. UU.).

La unión positiva en extractos de cerebro se confirmó usando el anticuerpo 6E10.

**Análisis SPR:** Se combinaron y analizaron 4 extractos de cerebro de pacientes con EA y 4 extractos de cerebro de controles de la misma edad. Las muestras de cerebro, homogeneizadas en TBS, incluían el área 9 de Brodmann de la corteza frontal. Todos los experimentos se realizaron usando un sistema de detección de afinidad molecular (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburgo, Alemania), un biosensor analítico que emplea luz láser de alta intensidad y escaneo óptico de alta velocidad para monitorear las interacciones de unión en tiempo real. Los anticuerpos purificados generados para los ciclopéptidos descritos en la presente memoria se capturaron en celdas de flujo separadas de un chip sensor derivatizado con proteína A y se inyectaron muestras diluidas sobre las superficies durante 180 segundos, seguido de 120 segundos de disociación en tampón y regeneración de la superficie. Se hicieron referencias dobles a las respuestas de unión restando la unión de la superficie de referencia de IgG de control de ratón y el tampón de ensayo, y se compararon los diferentes grupos de muestras.

## Resultados

### Extractos de cerebro, LCR e inmunohistoquímica

Se analizó la capacidad de los anticuerpos para unirse a A-beta en extractos de cerebro solubles, LCR y muestras de tejido de cerebros de control sano cavadérico y con EA; los resultados se muestran en la tabla 6. La fuerza de la positividad en la tabla 6 se muestra mediante el número de signos más.

Cada uno de los anticuerpos 301-11 y 301-17 mostró una unión positiva con homogeneizados de cerebro y LCR de pacientes con EA en comparación con pacientes de control.

Como se muestra en la tabla 6, los anticuerpos purificados mostraron una unión preferencial a EA frente a no EA en extractos de cerebro solubles y LCR, y no se unieron apreciablemente a las fibrillas de la placa mediante IHC.

Tabla 6: Resumen de características de unión

Anticuerpo	Oligómeros/Monómeros	Extracto de cerebro con Ea/sin EA	IHC - Tinción de placa (cerebro de sección congelada 1630)	LCR
301-3	++	++	-	+
301-11	++	+++	-	++
301-17	++	++	-	+
* La puntuación es relativa a otros clones que no se muestran aquí en la misma categoría de muestra.				

### Ejemplo 3

Unión a oligómeros sintéticos A-beta.

Para verificar y validar aún más la unión del oligómero A-beta<sub>42</sub>, se inmovilizaron covalentemente anticuerpos purificados en un chip sensor, seguido de la inyección sobre la superficie de oligómeros A-beta<sub>42</sub> estables (1 microM) preparados comercialmente (SynAging SAS, Vandœuvre-lès-Nancy, Francia).

Los anticuerpos 301-3, 301-11 y 301-17 se unieron a los oligómeros A-beta 42 estables (1 microM) con unidades de respuesta de unión (BRU) de un promedio de 14,5 (301-3), 19,3 (301-11) y 30 (301-17), respectivamente. En comparación, la IgG1 de control negativo no se unió significativamente a los oligómeros (unión media de BRU 2,5), mientras que el anticuerpo de control positivo pan-Aβ 6E10 se unió con un BRU promedio de 90.

### Ejemplo 4

#### Inmunohistoquímica en tejidos fijos con formalina

Se evaluaron secciones de tejido cerebral con EA humana usando los anticuerpos 301-11, 301-17. El paciente había sido previamente caracterizado y diagnosticado de enfermedad de Alzheimer con un abordaje tripartito: (i) método de plata de Bielschowsky para demostrar placas seniles y ovillos neurofibrilares, (ii) rojo Congo para demostrar amiloide y (iii) inmunohistoquímica de tau para demostrar ovillos y confirmar que las placas seniles son "neuríticas". Este tejido se usó para probar la reactividad en placa de clones de anticuerpos monoclonales seleccionados. Los tejidos cerebrales se fijaron en formalina tamponada al 10 % durante varios días y se procesaron con parafina en los procesadores de tejidos Sakura VIP. Se sondaron secciones de tejido con 1 µg/ml de anticuerpo con y sin recuperación de antígeno por microondas (AR). El anticuerpo reactivo pan-amiloide beta 6E10 se incluyó junto con clones de anticuerpos seleccionados como control positivo. Los anticuerpos se diluyeron en Antibody Diluent (Ventana), el color se reveló con OptiView DAB (Ventana). La tinción se realizó en el teñidor Ventana Benchmark XT IHC. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Olympus BX45. Las imágenes fueron analizadas a ciegas por un patólogo profesional con experiencia en neuropatología.

Como se muestra en la tabla 7 a continuación, utilizando tejido fijado, los anticuerpos analizados fueron negativos para la tinción específica de amiloide de placa senil. El anticuerpo 6E10, usado como control positivo, mostró una fuerte tinción de placa.

Tabla 7

	Anticuerpos	Tinción de amiloide de placa senil
	301-11	Neg
	301-17	Neg
Control positivo	6E10	Fuertemente positivo

## Ejemplo 5

Anticuerpos recombinantes IgG1 e IgG2a

Se prepararon construcciones recombinantes de IgG1 e IgG2a 301-17 injertando las CDR de 301-17 derivadas de hibridoma en una estructura principal de IgG1 o IgG2a murina (WuXi, Biologics). Las secuencias se proporcionan en la tabla 8.

Tabla 8 - Secuencias de cadena pesada y cadena ligera para los isotipos 301-17

Anticuerpo e isotipo	Secuencia de ADNc	Secuencia polipeptídica
301-17 IgG1 Id. de sec. n.º: 90, 91	<p>CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCTGGCGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA          GCTCTGCTGAAGATGCTCTGCAGAGGCTCGGGCTACTCTTCAATC          AGCTACTGGATCAACTGGGTGAGCAGAGGCGCCGACAGGGCCTG          GATGGGATTGGAGACGTGCACCTGTGCGCGGGAGTGTCCACCTAC          AACGCCAAGTTCAGGTCCAAGGCCACCTGACCTTGGACACCTCC          AGCTGCACCGCTACATGCAGCTGTCTCTGCTGACCTGCGAGTAC          TCCGCGCTGTACTACTCTGAGCAGGTCCCGCGGCACACCTACTGG          TTTTTCGACCTGTGGGGGCGCGGAGCCACAGTGCACCTGTCTCTCC          GCGAAGACGACACCGCCATCTGTCTATCCACTGCGCGCTGGATCT          GCTGCTCAAACTAACTCCATGGTTCACCTGGGATGCGCTGGTCAAG          GGCTATTTCCCTGAGCCAGTGCAGCTGACCTGGAACTCTGGATCC          CTCTCCAGCGGTGTCCACACCTTCCAGCTGTCTCTGGAGTGTGAC          CTCTACACTCTGAGCAGCTCACTGACTGTCTCCCTCCAGCCCTCGG          CCCAGCGAGGCCGTCACTGCAACCTTCCCACTCCGCGCAGCGAC          ACCTAGCTGGACACGAAATTTGTGCGCGAGGATTTGTGTTGTAAAG          CCTGCTATATGTACAGTCCCGAGAGTATCATCTGTCTCTCTCTTC          CCCCCAAGGCCAAGGATGTGCTCAGCATTAATCTGACTCCTAAG          GTCACTGTCTGTGTGTAGACATCAGCAGGATGATCCCGAGGTTC          CAFTTCAGCTGTCTGTGTATGATGATGTGAGGTGCACACAGCTCAG          AGCGAACCCCGGGAGGAGCAGTTCACAGGCACTTTCGCGCTCAGTC          AGTGAATTTCCCATCATGCAACCAAGCACTGGCTCAATGSCAAGTGG          TTCAAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCGCCCATCGAG          AAAACCATCTCCAAAACCAAGGCGAGCCGAGGCTCCACAGGTG          TACACCATTCACCTTCCCAAGGAGCAGATGGCCAGGATAAATTC          AGCTGACCTGCACTGATTAACAGACTTCTTCCCTGAGACATTAAT          GTTGAAGTGGAGTGCAGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG          ACTGAGCCCATCATGAGACAGGATGGCTCTTACTTCTCTACAGC          AAGCTCAATGTGCAAGAGAGCACTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG          ACTGTGCTGTGTGTACATGAGGCGCTGACACAGCAGGAGGAGGAGGAG          AAGAGCTCTCTCCACTCTCTCTGTATATGATGA</p>	<p>QVQLQQPGAE LVPKGA          SVHMSCKASSEYSPFSY          WINWVKQRFPGQGLEWI          GDVHPGRGVSTYNKSF          KSKATLTLDTSSTAY          MQLSSLTSEDZAVYYC          ERSHGNTYWFDFVWGR          GTTVTVSSAKITFPFV          YPLAPGSAAGTNSMVF          LGCLVKGYFPEPVTV          WNSGRLSSGVRTFPFV          LESDLYTLSSSVTVPS          SPRPSETVTCNVAFPA          SSTFVDMIVPRDGGC          KPCICTVFEVSSVFI          FFWFKDVLITITLFPKV          TCVVVDISKIDPEVQF          SWYVDDVEVHTAQTGP          REEQFNSTFRSVSELP          IMHQDWLNGKESKCV          NSAAFEAPTEKTLST          KGRPKAPQVYTIFFPK          EQMAKDKVSLTCHITD          FFPEDITVEWQWNGQP          AENTKNTQPIKNTNGS          YFVYSKLVNPKSNWEA          GNTFTCSVLSEGLNH          HTEKSLSHSPGK</p>

5	301-17 IgG2a Id. de sec. n.º: 92, 93	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA GCCTCCGTGAAGATGTCTTGCAAGGCTCCGGCTACTCCTTCACC AGCTACTGGATCAACTGGGTGAAGCAGAGGCCCGGACAGGGCCTG GAGTGGATTGGAGACGTGCACCCTGGCCGGGGAGTGTCCACCTAC AACGCCAAGTTCAGTCCAAGGCCACCCTGACCTGGACACCTCC AGCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGAC TCCGCCGTGTACTACTGCAGCAGGTCCACCGCAACACCTACTGG TTTTTTCGACGTGTGGGGCGCCGGAACACAGTGAACCTGTCTCTCC GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGT GGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAG GGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCC CTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTCTGAGTCTGAC CTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGAACCTCGAGCACCTGG CCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCACCCGGCAAGCAGC ACCAAGGTGGACAAGAAAATGAGCCAGAGGGCCCAACATCAAG CCCTGTCTCCATGCAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGA CCATCCGTCTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATG ATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGC GAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTG GAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCATAGAGAGGATTACAAC AGTACTCTCCGGGTGGTCACTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGAC TGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGAC CTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCA GTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAG ATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCAAGACTTC ATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACACGGGAAAACA GAGCTAACTACAAGAACACTGAACAGTCTTGACTCTGATGGT TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAGAAGAAGTGG GTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTG CACAATCACCACAGCTAAGAGCTTCTCCCGACTCCGGGTAAAT TGATGA	QVQLQQPGAELVKPGA SVKMSCKASGYSFTSY WINWVKQRPQGQLEWI GDVHPGRGVSTYNAKF KSKATLTLDTSSTSTAY MQLSSLTSEDSAVYYC SRSHGNTYWFDFVWGA GTTVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVT LGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVTS STWPSQSITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRGPTI KPCPCKCPAPNLLGG PSVFIFFPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFEVNNVEVH TAQTQTHREDYNSTLR VVSALPIQHQQWMSGK EFKCKVNNKDLPAPIE RTISKPKGSVRAPQVY VLPPEEEMTKKQVTL TCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTPEV LDSGSGYFMYSKLRVE KKNWVERNSYSCSVVH EGLHNHHTTKFSRTP GK
30	301-17 Kappa Id. de sec. n.º: 94, 95	GATGTGCTGATGACCCAGACCCCTCTGTCCCTGCCTGTGTCCCTG GGCGATCAGGCCAGCATCTCCTGCAGTCTCCTCCAGTCCATCGTG CACTCCAACGGCAACACCTACCTGGAGTGGTACCTGCAGAAGCCC GGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTC TCCGGCGTGCCCGATAGGTTCTCCGGATCCGGCTCCGGCACCGAC TTTACCCTGAAGATCTCCAGGGTGGAGGCCGAGGACCTGGGCGTG TACTACTGCTTTCAAGGGCTCCACGTGCCCTTCACTTTCGGCTCC GGCACCAGCTGGAGATCAAGCGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA TCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAATCTGAGGAGTGCC TCAGTCTGTGTCTTCTTGAACAACCTTACCCCCAAGACATCAAT GTCAAGTGGAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTCTG AACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACCTACAGCATG AGCAGCACCTCAGCTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAAC AGCTATACCTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTTCACCCATT GTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTGATGA	DVLTQTPLSLPVS LG DQASISCRSSQSI VHS NGNTYLEWYLQKPGQS PKLLIYKVS NREFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQG SHVPFTFGSGTKLEIK RADAAPTVSIFFPSSE QLTSGGASVVCFLNNF YPKDINVKWKIDGSE QNGVLNSWTDQDSKDS TYSMSSTLTTLTKDEYE RHNSYTCEATHKTS PIVKS FNRNEC

Los anticuerpos 301-17 IgG1 e IgG2a recombinantes se analizaron y compararon con el anticuerpo IgG3 purificado con hibridoma original para determinar las características de unión como se describe a continuación.

Unión del biosensor de proteína IgG2a 301-17 (BioRad) a AbO: Se capturaron 301-17 IgG2a recombinante y 301-17 IgG3 purificada con hibridoma con IgG anti-ratón o acoplamiento de amina en chips de sensor Proteon GLM y se analizaron para determinar la unión de AbO (SynAging AbO). Se usaron diluciones de AbO 3 veces: 1 µM, 0,33 µM, 0,11 µM, 37 nM, 12,3 nM. El tampón de ensayo fue PBS-E + Tween 20 + 2 mg/ml de BSA.

Resultados:

Los valores cinéticos aproximados fueron:

Hibridoma:

KD = 26.9 nM

Anticuerpo IgG2a-301-17: KD = 16,2 - 19,5 nM. No se detectó unión con IgG de ratón de control.

301-17 IgG2a ProteOn Biosensor (BioRad) Unión al epítipo del péptido cíclico: La IgG2a 301-17 recombinante se acopló con amina al chip biosensor Proteon GLH y se analizó su unión al ciclopéptido de la Id. de sec. n.º 2 acoplado a BSA. Se usaron diluciones triples de ciclo-BSA desde 9 nM hasta 111 pM. El tampón de ensayo fue PBS-E + Tween

al 0,05 % + BSA 10 mg/ml. Se encontró que el anticuerpo 301-17 IgG2a se une al péptido cíclico (Id. de sec. n.º: 12) conjugado con BSA con una KD aproximada de 17 pM (promedio de 3 pruebas). Se detectó una unión nula o insignificante para otros anticuerpos Abeta comerciales probados (pan-Abeta 6E10, Biolegend) y anticuerpos anti-Abeta de conejo (D54D2, Cell Signaling; ab201060, (abcam; NBP1-78007, Novus).

*Unión de 301-17 IgG1 MAAS-2 a AbO:* Se inmovilizaron 301-17 IgG1 recombinante y 301-17 IgG3 purificada con hibridoma en chips sensores MAAS-2 y se analizó su unión a AbO (SynAging) a 1 uM. En las condiciones analizadas, el anticuerpo IgG1 301-17 recombinante dio una señal mayor que el anticuerpo purificado con hibridoma en 2 pruebas (40-55 BRU frente a 15-25 BRU, respectivamente). Se detectó poca o ninguna unión con la IgG de ratón de control.

*Unión de 301-17 IgG1 MAAS-2 al epítipo del péptido cíclico:* Se inmovilizó IgG1 301-17 recombinante en un chip sensor MAAS-2 y se analizó su unión al ciclopéptido de la Id. de sec. n.º: 12 acoplado a BSA a pH 6,5, 7,5 u 8,0. Se observaron niveles de unión equivalentemente altos para 301-17 IgG1 en las 3 condiciones de pH (-400 BRU). Se detectó poca o ninguna unión en cualquiera de las condiciones de pH para la IgG de ratón de control o el anticuerpo pan-Abeta 6E10 (Biolegend)

#### Ejemplo 6

##### Inhibición de la propagación de oligómeros

La funcionalidad biológica de los anticuerpos se probó in vitro examinando sus efectos sobre la agregación de beta amiloide (A $\beta$ ) usando el ensayo de unión de tioflavina T (ThT). La agregación de A $\beta$  es inducida y propagada a través de núcleos de oligómeros de A $\beta$  pequeños preformados, y el proceso completo desde A $\beta$  monomérico hasta oligómeros solubles y fibrillas insolubles se acompaña de un aumento concomitante de la formación de láminas beta. Esto puede controlarse mediante ThT, una sal de benzotiazol, cuyos máximos de excitación y emisión cambian de 385 a 450 nm y de 445 a 482 nm, respectivamente, cuando se unen a estructuras ricas en láminas beta, lo que da como resultado una mayor fluorescencia. Brevemente, se solubilizó A $\beta$  1-42 (Bachem Americas Inc., Torrance, CA), se sonicó, se diluyó en tampón Tris-EDTA (pH 7,4) y se añadió a pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos negra (Greiner Bio-One, Monroe, NC) a los que se añadieron volúmenes iguales de anticuerpo generado con ciclopéptido o controles de isotipo de anticuerpo IgG de ratón irrelevante, dando como resultado una relación molar de 1:5 de péptido A $\beta$ 1-42 a anticuerpo. Se añadió ThT y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas, con mediciones de fluorescencia de ThT (excitación a 440 nm, emisión a 486 nm) registradas cada hora usando un contador multietiqueta Wallac Victor3v 1420 (PerkinElmer, Waltham, MA). Las lecturas fluorescentes del tampón de fondo se restaron de todos los pocillos y las lecturas de los pocillos de anticuerpos únicamente se restaron de los pocillos correspondientes.

La agregación de A $\beta$ 42, monitoreada por fluorescencia ThT, demostró una forma sigmoidea caracterizada por una fase de retraso inicial con fluorescencia mínima, una fase exponencial con un rápido aumento de la fluorescencia y finalmente una fase de meseta durante la cual las especies moleculares de A $\beta$  están en equilibrio y durante la cual no hay aumento de la fluorescencia. La coincubación de A $\beta$ 42 con un anticuerpo de ratón irrelevante no tuvo ningún efecto significativo sobre el proceso de agregación. Por el contrario, la coincubación de A $\beta$ 42 con los anticuerpos de prueba inhibió completamente todas las fases del proceso de agregación. Los resultados obtenidos con el anticuerpo 301-11 se muestran en la Figura 1.

Se obtuvieron resultados casi idénticos con 301-17 y 301-3.

Como el ensayo de agregación de ThT imita las etapas biofísicas/bioquímicas in vivo de la propagación de A $\beta$  y la agregación de monómeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas que son fundamentales en la patogénesis de la EA, los anticuerpos demuestran el potencial de anular completamente este proceso. El control de isotipo realizado con anticuerpo de control IgG de ratón no mostró inhibición.

#### Ejemplo 7

##### Ensayo de inhibición de la toxicidad.

La inhibición de la toxicidad de los oligómeros A-beta42 por anticuerpos se puede probar en un ensayo de neurona cortical primaria de rata.

El anticuerpo y la IgG de control se ajustan cada uno a una concentración tal como 2 mg/ml. Se prueban diversas proporciones molares de oligómero A-beta y anticuerpo junto con un control de vehículo, oligómero A-beta solo y un control positivo como el péptido neuroprotector humanina HNG.

En la tabla 9 se muestra una configuración a modo de ejemplo.

Después de una preincubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se ajusta el volumen a 840 microlitros con medio de cultivo. La solución se incuba durante 5 min a 37°C. Luego, la solución se añade directamente a las neuronas corticales primarias y las células se incuban durante 24 h. La viabilidad celular se puede determinar mediante el ensayo MTT.

Tabla 9

Razón molar A $\beta$ O / MAB	A $\beta$ O ( $\mu$ l)	A $\beta$ O ( $\mu$ M)	AB ( $\mu$ M)	AB ( $\mu$ l)	Medio ( $\mu$ l)	Volumen final ( $\mu$ l)
5/1	1,68	4,2	0,84	12,73	185,6	200
1/1	1,68	4,2	4,20	63,64	134,7	200
1/2	1,68	4,2	8,4	127,27	71,1	200

Solución de trabajo de A $\beta$ O: 2,2 mg/ml - 500 $\mu$ M	
CTRL vehículo:	1,68 $\mu$ l de tampón oligómero + 127,3 $\mu$ l de PBS + 711 $\mu$ l de medio de cultivo
CTRL A $\beta$ O:	1,68 $\mu$ l de A $\beta$ O + 127,3 $\mu$ l de PBS + 711 $\mu$ l de medio de cultivo
CTRL HNG:	1,68 $\mu$ l de A $\beta$ O + 8,4 $\mu$ l de HNG (100 nM final) + 127,3 $\mu$ l de PBS + 702,6 $\mu$ l de medio de cultivo

En ausencia de oligómeros A-beta, el anticuerpo 301-17 por sí solo no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células neuronales. Cuando se incubó en presencia de oligómeros A-beta, el anticuerpo inhibió la muerte neuronal inducida por el oligómero A-beta en todas las proporciones molares analizadas.

#### Ejemplo 8

##### Ensayo de inhibición de la toxicidad in vivo

La inhibición de la toxicidad de los oligómeros A-beta<sub>42</sub> por los anticuerpos se puede probar in vivo en ensayos de comportamiento en ratones.

##### Reconocimiento de objetos novedosos (NOR)

El modelo de reconocimiento de objetos novedosos (NOR) utiliza el comportamiento normal de los roedores para investigar objetos novedosos durante un tiempo significativamente más largo que los objetos conocidos. Esta prueba evalúa la memoria de reconocimiento de elementos y su equivalente humano es la comparación visual por pares (VPC). El reconocimiento de objetos está mediado por la corteza perirrinal en roedores, primates y humanos. La patología de la EA se desarrolla primero en la corteza perirrinal y entorinal antes del hipocampo. La tarea VPC detecta el déficit de memoria en el deterioro cognitivo leve (DCL) y esta tarea predice la conversión de DCL a EA (16).

##### Resultados:

El ensayo fue realizado por (SynAging SAS, Vandœuvre-lès-Nancy, Francia). A doce ratones C57BL6J por grupo (11-12 semanas de edad) se les inyectó ICV con vehículo (tampón usado para la oligomerización de A $\beta$ ) o A $\beta$ O (50 pmol) en presencia de vehículo (PBS) o anticuerpo 301-17 el día 0. El rendimiento cognitivo de todos los ratones se determinó mediante una prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR) realizada en los días +7 y +8.

El estudio, realizado a ciegas para los operadores, involucró a un total de 48 ratones divididos en cuatro grupos experimentales con 12 ratones por grupo experimental. Todos los animales recibieron una inyección ICV única (y unilateral) de vehículo O A $\beta$ O en ausencia o presencia de anticuerpo en un volumen total de 5  $\mu$ l. Los grupos experimentales se definieron de la siguiente manera:

- GRUPO A (CTRL vehículo): Inyección ICV del vehículo (n = 12)
- GRUPO B (CTRL A $\beta$ O): Inyección ICV de A $\beta$ O (n = 12)
- GRUPO C (Anticuerpo CTRL): Inyección ICV de A $\beta$ O + anticuerpo (n = 12)
- GRUPO D (Tratamiento): Inyección ICV de A $\beta$ O + anticuerpo (n = 12)

Antes de la inyección de ICV, se incubaron 4  $\mu$ l de anticuerpo 1 (es decir, 112 pmol) durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1  $\mu$ l de vehículo (es decir, tampón para la oligomerización de A $\beta$ ) o 1  $\mu$ l de A $\beta$ O (50 pmol) correspondiente a una razón molar de anticuerpo/A $\beta$ O de 2,24.

El día 0, los ratones recibieron una única inyección ICV de 5  $\mu$ l de vehículo o A $\beta$ O en presencia de vehículo o anticuerpo.

La prueba NOR se realizó en un ensayo con los 48 ratones en los días +7 y +8. Un día antes de la prueba cognitiva (es decir, el día +7), los ratones se habitúan durante una prueba de 10 minutos durante la cual se colocan en un campo abierto y vacío. El día de la prueba cognitiva (es decir, día +8), los animales se colocan en el mismo campo abierto y se les permite explorar libremente dos objetos idénticos durante una prueba de cinco minutos (prueba de adquisición). Luego, los animales se devuelven a su jaula de origen durante un tiempo entre pruebas de cinco minutos. Durante la prueba de retención, a los animales se les permite explorar dos objetos diferentes: el mismo objeto familiar y un objeto nuevo. Durante este tiempo, el experimentador, ciego al tratamiento, registra el tiempo que el ratón está explorando activamente cada objeto. Todas las pruebas se graban en vídeo (software Smart v3.0, Bioseb). Luego se genera un índice de discriminación (DI):  $(DI) = (\text{tiempo explorando objeto novedoso} - \text{tiempo explorando objeto familiar}) / \text{tiempo total de exploración}$ . Si el tiempo total de exploración es  $\leq 5$  s, los animales quedan excluidos del cálculo del índice de discriminación y del análisis estadístico.

Los ratones del grupo de control del vehículo (Grupo A) mostraron un comportamiento normal con un índice de discriminación medio de  $0,443 \pm 0,053$ . Estos resultados concuerdan con observaciones previas de grupos de control similares en SynAging. Como se esperaba, una única inyección ICV de A $\beta$ O (Grupo B) resultó en un deterioro significativo ( $p < 0,0001$ ) del rendimiento cognitivo en comparación con los ratones de control con vehículo; con un índice de discriminación medio de  $-0,062 \pm 0,048$ . Los ratones inyectados con A $\beta$ O no pudieron discriminar entre objetos nuevos y familiares.

Se encontró que los ratones a los que se les administró anticuerpos en presencia de vehículo (Grupo C) exhibieron un rendimiento cognitivo normal con un índice de discriminación medio de  $0,439 \pm 0,049$ . Estos ratones no fueron significativamente diferentes de los ratones de control con vehículo ( $p = 0,9163$ ) y significativamente diferentes de los ratones inyectados con A $\beta$ O ( $p < 0,0001$ ).

Cuando se inyectó conjuntamente con A $\beta$ O, el anticuerpo previno por completo los déficits cognitivos inducidos por A $\beta$ O en la prueba NOR. De hecho, los ratones del grupo D exhibieron un índice de discriminación medio de  $0,481 \pm 0,055$ , no diferente de los ratones de control ( $p = 0,6126$ ) pero sí diferente de los ratones inyectados con A $\beta$ O ( $p = 0,0002$ ). En conjunto, los datos sugieren que el anticuerpo 301-17 ofrecía protección contra los déficits cognitivos inducidos por A $\beta$ O.

#### Marcadores sinápticos

Además de los ensayos de comportamiento, se puede recolectar y analizar tejido cerebral para determinar los niveles de marcadores sinápticos (PSD95, SNAP25, sinaptofisina) y marcadores de inflamación (IL-1-beta y TNF-alfa). Los ratones se sacrifican aproximadamente 14 días después de la inyección de oligómeros con ICV y se perfunden con solución salina. Los hipocampos se recogen, se congelan rápidamente y se almacenan a  $-80$  °C hasta su análisis. Las concentraciones de proteínas de las muestras homogeneizadas se determinan mediante BCA. La concentración de marcadores sinápticos se determina utilizando kits ELISA (Cloud-Clone Corp, EE. UU.). Normalmente, los marcadores sinápticos se reducen entre un 25 y un 30 % en ratones inyectados con oligómeros A-beta y se restablecen entre un 90 y un 100 % mediante el control positivo de humanina. Las concentraciones de los marcadores inflamatorios IL-1-beta aumentan aproximadamente 3 veces en ratones inyectados con oligómeros A-beta y la humanina previene en gran medida este aumento.

Los cerebros se recogen de ratones que se sometieron a pruebas de comportamiento.

El hipocampo (estructura relevante para la formación de la memoria) se disecciona y se homogeneiza en un tampón RIPA que contiene un cóctel antiproteasa. El tejido se lisa mediante 3 ciclos de congelación y descongelación realizados en nitrógeno líquido y un baño de agua a  $37$  °C y los sobrenadantes se recuperan después de centrifugar.

El lisado se puede analizar para determinar los niveles de TNF-alfa (aumenta con la inflamación) y los niveles de los marcadores sinápticos PSD-95 y SNAP-25 (que disminuyen cuando hay daño sináptico).

El anticuerpo mostró una protección completa en el ensayo de comportamiento. Se espera que los cerebros también muestren una mejora en los niveles de SNAP25 y PSD-95 y una disminución en los niveles de TNF-alfa en el cerebro.

#### Ejemplo 9

##### Ensayo de inhibición de la propagación in vivo

La propagación in vivo de oligómeros tóxicos A-beta y la patología asociada se pueden estudiar en diversos modelos de roedores de la enfermedad de Alzheimer (EA). Por ejemplo, los ratones transgénicos para APP humana (por ejemplo, ratones APP23) o APP humana y PSEN1 (ratones APPPS1) expresan niveles elevados de A-beta y exhiben una deposición gradual de amiloide con la edad acompañada de inflamación y daño neuronal. La inoculación intracerebral de extractos de cerebro que contienen oligómeros puede acelerar significativamente este proceso (13, 14). Estos modelos proporcionan un sistema para estudiar la inhibición de la propagación del oligómero A-beta mediante anticuerpos de prueba administrados por vía intracerebral o sistémica.

##### Tabla 10 Secuencias y compuestos A-beta



1)

HHQK (Id. de sec. n.º: 7)

5 CGHHQKG, ciclo(CGHHQKG) (Id. de sec. n.º: 12)

Tabla 11

10 A-beta 1-42 humano

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (Id. de sec. n.º: 73)

Ejemplo 12

15 **Anticuerpos recombinantes (HHQK)** Se prepararon constructos recombinantes de IgG1 e IgG2a 301-17 injertando la región variable de 301-17 derivado de hibridoma en una estructura principal de IgG1 o IgG2a murina (WuXi, Biologics).

20 Los anticuerpos 301-17 IgG1 e IgG2a se analizaron y compararon con el anticuerpo IgG3 purificado con hibridoma original para determinar las características de unión como se describe a continuación.

25 Unión del biosensor de proteína IgG2a 301-17 (BioRad) a AbO: Se capturaron 301-17 IgG2a recombinante y 301-17 IgG3 purificada con hibridoma con IgG anti-ratón o acoplamiento de amina en chips de sensor Proteon GLM y se analizaron para determinar la unión de AbO (SynAging AbO). Se usaron diluciones de AbO 3 veces: 1 µM, 0,33 µM, 0,11 µM, 37 nM, 12,3 nM. El tampón de ensayo fue PBS-E + Tween 20 + 2 mg/ml de BSA.

Resultados:

Los valores cinéticos aproximados fueron:

30 Hibridoma: KD = 26,9 nM

Anticuerpo IgG2a-301-17: KD = 16,2 - 19,5 nM

35 No se detectó unión con la IgG de ratón de control.

La IgG1 301-17 recombinante tenía una KD similar a la del recombinante IgG2a.

40 301-17 IgG2a ProteOn Biosensor (BioRad) Unión al epítipo del péptido cíclico: La IgG2a 301-17 recombinante se acopló con amina al chip biosensor Proteon GLH y se analizó su unión al ciclopeptido de la Id. de sec. n.º: 2 acoplado a BSA. Se usaron diluciones triples de ciclo-BSA desde 9 nM hasta 111 pM. El tampón de ensayo fue PBS-E + Tween al 0,05 % + BSA 10 mg/ml. Se encontró que el anticuerpo 301-17 IgG2a se une al péptido cíclico (Id. de sec. n.º: 2) conjugado con BSA con una KD aproximada de 17 pM (promedio de 3 pruebas). Se detectó una unión nula o insignificante para otros anticuerpos Abeta comerciales probados (pan-Abeta 6E10, Biolegend) y anticuerpos anti-Abeta de conejo (D54D2, Cell Signaling; ab201060, (abcam; NBP1-78007, Novus).

50 Unión de 301-17 IgG1 MAAS-2 a AbO: Se inmovilizaron 301-17 IgG1 recombinante y 301-17 IgG3 purificada con hibridoma en chips sensores MAAS-2 y se analizó su unión a AbO (SynAging) a 1 µM. En las condiciones analizadas, el anticuerpo IgG1 301-17 recombinante dio una señal mayor que el anticuerpo purificado con hibridoma en 2 pruebas (40-55 BRU frente a 15-25 BRU, respectivamente). Se detectó poca o ninguna unión con la IgG de ratón de control.

55 Unión de 301-17 IgG1 MAAS-2 al epítipo del péptido cíclico: Se inmovilizó IgG1 301-17 recombinante en un chip sensor MAAS-2 y se analizó su unión al ciclopeptido de la Id. de sec. n.º: 2 acoplado a BSA a pH 6,5, 7,5 u 8,0. Se observaron niveles de unión equivalentemente altos para 301-17 IgG1 en las 3 condiciones de pH (-400 BRU). Se detectó poca o ninguna unión en cualquiera de las condiciones de pH para la IgG de ratón de control o el anticuerpo pan-Abeta 6E10 (Biolegend)

Ejemplo 13

60 Unión de anticuerpos humanizados en extractos de cerebro solubles

Métodos

65 Conjunto de extractos de cerebro solubles inyectados a 0,5 ml/min a través de una columna de HPLC Superdex 75(10/300) durante 50 minutos y fracciones de 0,25 ml recogidas:

Los extractos solubles de cerebro humano con EA se separaron en fracciones LMW (<70 kDa) y de alto peso molecular (HMW; >70 kDa) mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). La unión del anticuerpo a las fracciones SEC se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR).

- 5 Específicamente, se concentraron las fracciones combinadas y se determinó la concentración de proteína total mediante ensayo BCA. Las fracciones combinadas se diluyeron a 100 µg/ml y se inyectaron sobre anticuerpos inmovilizados en un chip sensor de MASS2.

#### Resultados

- 10 El fraccionamiento SEC de extractos solubles de cerebro humano con EA dio lugar a un patrón reproducible con picos de BPM consistentes con la presencia de dímeros, tetrámeros y dodecámeros supuestamente tóxicos. Se comparó el anticuerpo humanizado de 301-17 (VH2 Vk5) (Id. de sec. n.º: 45, 46 y la Id. de sec. n.º: 65, 66) con la versión monoclonal de ratón (301-17; tabla 3) y otros anticuerpos A-beta.

- 15 Como se muestra en la Figura 2, el anticuerpo monoclonal de ratón 301-17 y el aducanumab muestran una unión equivalente a la fracción BPM enriquecida con oligómeros tóxicos del extracto soluble de cerebro humano con EA.

- 20 El análisis SPR mostró una unión preferencial del 301-17 humanizado a la fracción LMW enriquecida con oligómeros tóxicos en comparación con aducanumab y bapineuzumab. La respuesta de unión del 301-17 humanizado para la fracción LMW fue entre -1,5 y 2 veces mayor que la obtenida con aducanumab.

#### Ejemplo 14

- 25 **Métodos:** Se tiñeron secciones de cerebro humano con EA congeladas con 301-17 humanizado y otros anticuerpos dirigidos por Abeta para evaluar el grado de unión a la placa parenquimatosa de Abeta y a los depósitos vasculares de A beta.

- 30 **Resultados:** Se observó una unión clara de Abeta parenquimatosa y vascular en el cerebro con EA con aducanumab y bapineuzumab, lo que coincide con la aparición clínica de ARIA asociada con estos anticuerpos. En comparación, no se observó inmunorreactividad de los depósitos de Abeta con 301-17 humanizado (VH2Vk5).

- 35 **Conclusiones:** Los resultados obtenidos con material de pacientes con EA (ej. 13 y 14) sugieren que el 301-17 humanizado puede lograr una mayor potencia terapéutica en comparación con otros anticuerpos dirigidos contra EA debido a: 1) direccionamiento selectivo de oligómeros de BPM tóxicos solubles y 2) riesgo reducido de ARIA, lo que permite la administración segura de dosis más altas de anticuerpos. Estos datos se muestran en la Figura 3.

#### Ejemplo 15

- 40 Monómeros y oligómeros de Aβ

- 45 El péptido Aβ42 recombinante (California Peptide, Salt Lake City UT, EE. UU.) se disolvió en hexafluoroisopropanol (HFIP) helado. El HFIP se eliminó por evaporación durante la noche y se secó en una centrífuga SpeedVac. Para preparar monómeros, la película peptídica se reconstituyó en DMSO hasta 5 mM, se diluyó aún más hasta 100 µM en agua destilada (dH2O) y se usó inmediatamente. Los oligómeros se prepararon diluyendo la solución de péptido DMSO 5 mM en medio F12 sin rojo fenol (Life Technologies Inc., Burlington ON, Canadá) hasta una concentración final de 100 µM y se incubaron durante 24 horas a 4 °C seguido de su uso inmediato o almacenamiento a -80°C.

#### Extracto de cerebro

- 50 Se obtuvieron tejidos cerebrales de 11 pacientes humanos diferentes con EA del Banco de Cerebros y Tejidos de la Universidad de Maryland y del Dr. Jiri Safar de la Universidad Case Western Reserve (Cleveland, Ohio, EE. UU.). El diagnóstico clínico de EA se basó en los criterios NINCDS-ADRDA. Se pesaron muestras de la corteza frontal y posteriormente se sumergieron en un volumen de tampón TBS fresco helado y cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA de Roche Diagnostics (Laval QC, Canadá) de tal modo que la concentración final de tejido cerebral fuera del 20 % (p/v). El tejido se homogeneizó en este tampón usando un homogeneizador de sonda mecánica (pulsos de 3 x 30 segundos con pausas de 30 segundos entre ellos, todos realizados en hielo). Luego, las muestras homogeneizadas con TBS se sometieron a ultracentrifugación durante 90 minutos. Los sobrenadantes (extractos solubles) se recogieron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de proteína de ácido bicinonínico (BCA). En cada análisis se usaron conjuntos de extractos cerebrales de 3 a 8 pacientes.

#### Cromatografía de exclusión por tamaño

- 65 Se inyectaron extractos de cerebro solubles combinados a 0,5 ml/min a través de una columna de HPLC Superdex 75 (10/300) durante 50 minutos y se recogieron fracciones de 0,25 ml. Los marcadores de peso molecular (MW) se procesaron por separado. Los picos de proteína se controlaron mediante absorbancia a D.O. 280 nm. Las fracciones

correspondientes a un MW de ~8 kDa a ~70 kDa se combinaron en una fracción de bajo peso molecular (BPM). Los monómeros A $\beta$  (MW ~4,5 kDa) se excluyeron de la fracción LMW. Las fracciones correspondientes a un MW de >70 kDa a ~700 kDa se combinaron en una fracción de alto peso molecular (HMW). Se concentraron las fracciones LMW y HMW y se determinó la concentración de proteína total en un ensayo BCA. Después, las fracciones se diluyeron en tampón PBS-EP, BSA (2 mg/ml) hasta 100  $\mu$ g/ml para análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR).

#### Medición de A $\beta$ total y A $\beta$ agregado en extracto de cerebro

La cantidad de A $\beta$  agregado y A $\beta$  total (monómeros y agregados) en las fracciones LMW y HMW de extractos solubles de cerebro humano con EA combinados (combinación de 3 cerebros) se midieron en QPS (Grambach, Austria). Las cantidades totales de A $\beta$ 38, 40 y 42 se determinaron en un ensayo inmunoabsorbente comercial (MSD, Rockville MD, EE. UU.) usando patrones peptídicos. Los niveles de A $\beta$  agregado se midieron usando el ensayo Amorfix Aggregated A $\beta$  Assay (A4). Brevemente, el A $\beta$  agregado se separó del A $\beta$  monomérico a través de la matriz de la placa de desagregación Amorfix. Mientras que los oligómeros se adhieren a la matriz, los monómeros se encuentran en el flujo. Después de dos etapas de lavado, los agregados de A $\beta$  unidos se monomerizan y eluyen con HFIP. El A $\beta$  monomerizado en el eluato de HFIP se secó bajo una campana extractora hasta la evaporación completa del HFIP y se resuspendió en tampón de ensayo. La medición de los agregados de A $\beta$  monomerizados resueltos se llevó a cabo en el ensayo MSD para A $\beta$ 38, 40 y 42. La concentración de proteína total en las fracciones de cerebro LMW y HMW se midió mediante BCA y los resultados se expresan como pg de especies de A $\beta$  por mg de proteína total.

#### Análisis de resonancia de plasmón superficial

Las mediciones de resonancia de plasmón superficial se realizaron usando un sistema de detección de afinidad molecular (Sierra Sensors GmbH, Hamburgo, Alemania). Los anticuerpos purificados se inmovilizaron en chips sensores. Se inyectaron sobre las superficies preparaciones de monómeros peptídicos de A $\beta$ , oligómeros de A $\beta$  sintéticos o extractos solubles combinados de cerebro de AD humano (100  $\mu$ g/ml) seguido de una fase de disociación. Los sensorgramas se restaron con doble referencia. Los resultados de SPR mostrados se replicaron en 2-8 estudios independientes.

#### Inmunohistoquímica

Se expusieron secciones de cerebro con EA congeladas frescas a tampón citrato de recuperación de antígenos (Target Retrieval Solution, Dako, Santa Clara CA, EE. UU.) durante 20 minutos y se incubaron en una cámara humidificada con reactivo de bloqueo de proteínas sin suero (Dako) durante 1 hora para bloquear tinción específica. Las secciones se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios (mu301-17, hu 301-17, aducanumab, bapineuzumab, controles de isotipo) a 1  $\mu$ g/ml y se lavaron 3 veces durante 5 minutos en solución salina tamponada con Tris que contenía TritonX al 0,1 %-100 (TBS-T) tampón. Anticuerpo de conejo anti-IgG humana conjugado con HRP secundario (0,4  $\mu$ g/ml; Abcam, San Francisco CA, EE. UU.) o anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón (dilución 1:1000; GE Healthcare, Chicago IL, EE. UU.) se añadieron anticuerpos a las secciones y se incubaron durante 1 hora, seguido de 3 lavados en tampón TBS-T. También se añadió anticuerpo secundario a las secciones que no estuvieron expuestas al anticuerpo primario como control negativo. Luego se añadió a las secciones el sustrato de la enzima HRP, reactivo cromógeno biaminobezidina (DAB) (Vector Laboratories, Burlingame CA, EE. UU.), seguido de enjuague con agua destilada. Las secciones se tiñeron con hematoxilina QS (Vector Laboratories, Burlingame CA, EE. UU.). Los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio óptico (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss Toronto ON, Canadá) y se capturaron imágenes representativas utilizando una cámara digital y un software Leica DC300 (Leica Microsystems Canada Inc., Vaughan ON, Canadá). Las imágenes mostradas son representativas de los resultados obtenidos con 3 cerebros con EA diferentes.

#### Exposición del sistema nervioso central

A ratones APP/PS1 (APP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup>) envejecidos y compañeros de camada de tipo natural (WT) (54-71 semanas de edad) se les inyectó por vía intraperitoneal (ip) 30 mg/kg de hu 301-17, aducanumab o vehículo (PBS) como control negativo. Se recogió plasma antes del tratamiento y los días 1, 7, 14 y 21 para evaluar los niveles circulantes de IgG humana. Los animales se sacrificaron inmediatamente después de la recolección de plasma y la perfusión de PBS. Luego se recogieron los cerebros y se congelaron instantáneamente. Los cerebros y el plasma se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se generaron homogeneizados de cerebro (10 % p/v) en tampón RIPA con un homogeneizador de tejido Omni (Omni International, Inc. Kennesaw, GA, EE. UU.), a la mitad de potencia durante 30 segundos, tres veces. Luego se sonicaron los homogeneizados durante 15 segundos a la mitad de potencia, seguido de la eliminación de los residuos mediante centrifugación (2.000 xg). Los niveles de IgG humana en plasma (dilución 1:10.000) y homogeneizados cerebrales (dilución 1:5) de ratones individuales se midieron utilizando el ELISA Human IgG Immunotek (Zeptomatrix, Buffalo NY, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresan como media  $\mu$ g/ml (plasma) o ng/g (cerebro)  $\pm$  EEM

#### Resultados

##### Comparación del perfil de unión de 301-17 humanizado con otros anticuerpos dirigidos a A $\beta$

El anticuerpo humanizado VH2Vk5 del isotipo IgG4 (mutación bisagra S241P) se comparó con otros anticuerpos. El anticuerpo humanizado retuvo la unión selectiva para los monómeros sintéticos de A $\beta$ O frente a A $\beta$  según lo evaluado

por SPR, así como la falta de unión a placa mediante inmunohistoquímica en secciones congeladas de cerebro con EA. Como se muestra en la Figura 3, los anticuerpos dirigidos a A $\beta$ , bapineuzumab y aducanumab, que se sabe que se unen a fibrillas, mostraron una tinción intensa de la placa parenquimatosa de A $\beta$  y de los depósitos vasculares, mientras que ni el monoclonal original (mu 301-17) ni el 301-17 humanizado mostraron ninguna tinción sobre el fondo. Se obtuvieron resultados similares con secciones de cerebro de ratones transgénicos APP/PS1 transgénicos envejecidos. La unión a la placa y a los depósitos vasculares en ensayos clínicos de EA se ha asociado con la inducción de anomalías en las imágenes relacionadas con el amiloide debido a edema (ARIA-E) y microhemorragias (ARIA-H).

Unión de hu301-17 a extractos de cerebro de AD solubles enriquecidos con oligómeros A $\beta$  tóxicos de bajo peso molecular

El examen de especies de A $\beta$  soluble en extractos de cerebro de EA realizado por varios investigadores ha indicado que la actividad neurotóxica reside principalmente en la fracción de bajo peso molecular (LMW) de A $\beta$ O (dímeros, trímeros, tetrámeros, dodecámeros), mientras que los agregados de alto peso molecular (HMW) se encuentran en gran medida inertes aunque, según se informa, pueden disociarse en especies de LMW. Por lo tanto, se realizó cromatografía de exclusión molecular (SEC) de extractos solubles agrupados de cerebros con EA. El fraccionamiento SEC del extracto soluble de cerebro con EA dio lugar a un patrón altamente reproducible con picos de proteínas en las regiones de PM que se esperaba que contuvieran LMW A $\beta$ O (Figura 4a). Las fracciones correspondientes a ~8 - 70 kDa se agruparon en una fracción de LMW que se esperaba que contuviera A $\beta$ O en el intervalo de dímero a dodecámero y excluyendo los monómeros. Las fracciones correspondientes a >70-700 kDa se combinaron en una fracción de HMW. Las mediciones de A $\beta$ 38, 40, 42 total (ensayo MSD) mostraron que las 3 especies estaban presentes tanto en las fracciones LMW como HMW, representando A $\beta$ 42 las principales especies de A $\beta$  agregadas (ensayo A4).

Mediante SPR se evaluó la unión de hu301-17 inmovilizado y otros anticuerpos dirigidos a A $\beta$  a las fracciones LMW y HMW del extracto soluble de cerebro de AD. En la Figura 4b se muestran resultados representativos de varios ensayos separados que utilizan diferentes extractos combinados derivados de múltiples cerebros con EA. El anticuerpo hu301-17 mostró consistentemente una unión alta y preferencial a la fracción LMW. En comparación, aducanumab y bapineuzumab mostraron una unión menor e indiscriminada de la fracción LMW frente a HMW.

Se determinó que la proteína A $\beta$  y los agregados de A $\beta$  estaban presentes en la fracción LMW, pero para descartar la posibilidad de que hu301-17 pudiera haberse estado uniendo a otras proteínas también presentes en esta fracción, se realizó un ensayo SPR tipo sándwich mediante el cual el material capturó por hu301-17 inmovilizado fue posteriormente expuesto a un anticuerpo detector. Se eligió aducanumab como anticuerpo detector porque se sabe que es específico para A $\beta$  y se esperaba que se uniera/detectara el material capturado por aducanumab inmovilizado, actuando así como control positivo. Como se ilustra en la Figura 4c, la detección de aducanumab en el ensayo sándwich produjo una señal contra el material capturado por hu301-17 o aducanumab, confirmando así la unión de hu 301-17 a A $\beta$ O en la fracción LMW. El material que da lugar a la baja señal observada después de la captura con IgG humana de control en este ensayo no fue detectado por aducanumab, lo que coincide con un bajo grado de unión de fondo no específica.

La naturaleza específica de la unión de hu301-17 se demostró aún más en un ensayo SPR que muestra que la exposición previa de hu301-17 inmovilizado a su epítipo de péptido cíclico afín impidió por completo la unión posterior a la fracción de LMW (Figura 4d). En comparación, la exposición previa de aducanumab inmovilizado al epítipo del péptido cíclico no tuvo un impacto apreciable en su capacidad para unirse posteriormente a la fracción LMW, ya que aducanumab reconoce un epítipo A $\beta$  diferente. En conjunto, estos resultados sugieren que hu301-17, además de ser selectivo para A $\beta$ O frente a monómeros y placa, también exhibe una focalización superior de la fracción enriquecida con oligómeros tóxicos de LMW del extracto de cerebro con EA en comparación con otros anticuerpos dirigidos a A $\beta$ .

Exposición del SNC a hu301-17 administrado sistémicamente

Se evaluó la capacidad de hu301-17 para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y entrar en el sistema nervioso central (SNC) desde la periferia y se comparó con la de aducanumab en ratones de edad avanzada (de 15 a 17 meses de edad). A los ratones se les administró una única inyección intraperitoneal (ip) de 30 mg/kg de anticuerpo y los niveles de IgG humana presentes en el plasma y los cerebros perfundidos se midieron 24 horas después mediante ELISA. Como se muestra en la Figura 5, se detectaron cantidades equivalentes de hu301-17 y aducanumab en plasma y cerebro (Figura 5a), lo que demuestra un grado comparable de penetrancia del SNC (Figura 5b) en el intervalo de -0,3 % como se informó anteriormente para aducanumab [18]. Como se esperaba, no se detectó IgG humana en ratones inyectados con PBS solo como control negativo (Figura 5a).

Se realizó una evaluación cinética adicional de hu301-17 en ratones APP/PS1 transgénicos de edad avanzada (13-17 meses) y compañeros de camada de tipo natural. Se midieron los niveles plasmáticos y cerebrales de IgG humana los días 1, 7, 14 y 21 después de la administración ip de 30 mg/kg. A pesar de la disminución de los niveles plasmáticos con el tiempo, los niveles detectables de hu301-17 en el cerebro todavía eran mensurables hasta el día 21 (Figura 6a, b). Curiosamente, los ratones APP/PS1 mostraron una tendencia a una mayor retención relativa de hu301-17 en el SNC frente al plasma a lo largo del tiempo, lo que coincide con la participación del A $\beta$ O diana presente en el cerebro de los ratones transgénicos pero no en los compañeros de camada de tipo natural (Figura 6c). Estos resultados indican que la penetrancia del SNC y las propiedades farmacocinéticas de hu301-17 son comparables a las de otros anticuerpos monoclonales contra dianas de A $\beta$ .

Citas para las referencias mencionadas en la memoria descriptiva

- [1] Gabriela AN Crespi, Stefan J. Hermans, Michael W. Parker y Luke A. Miles. Molecular basis for mid-region amyloid- $\beta$  capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies SCIENTIFIC REPORTS | 5: 9649, 2015| DOI: 10.1038/srep09649
- [2] Vicente J. Hilser y Ernesto Freire. Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. correlation with hydrogen exchange protection factors. J. Mol. Biol.,262.756-772, 1996. The COREX approach.
- [3] Samuel I. A. Cohen, y col. Proliferation of amyloid- $\beta$ 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110(24):9758-9763, 2013.
- [4] Pietro Sormanni, Francesco A. Aprile y Michele Vendruscolo. The camsol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. J of Mol Biol, 427(2):478-490, 2015.
- [5] Deborah Blacker, MD, ScD; Marilyn S. Albert, PhD; Susan S. Bassett, PhD; Rodney C. P. Go, PhD; Lindy E. Harrell, MD, PhD; Marshai F. Folstein, MD Reliability and Validity of NINCDS-ADRDA Criteria for Alzheimer's Disease The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. Arch Neurol. 1994;51(12):1198-1204. doi:10.1001/archneur.1994.00540240042014.
- [6] Hamley, I.W. PEG-Peptide Conjugates 2014; 15, 1543-1559; dx.doi.org/10.1021/bm500246w
- [7] Roberts, MJ y col. Chemistry for peptide and protein PEGylation 64: 116-127.
- [8] J.X.Lu, W.Qiang, W.M.Yau, C.D.Schwieters, S.C.Meredith, R.Tycko, MOLECULAR STRUCTURE OF BETA-AMYLOID FIBRILS IN AD BRAIN TISSUE. CELL vol. 154 pág.1257 (2013)
- [9] Y.Xiao, B.MA, D.McElheny, S.Parthasarathy, F.Long, M.Hoshi, R.Nussinov, Y.Ishii, A BETA (1-42) FIBRIL STRUCTURE ILLUMINATES SELF-RECOGNITION AND REPLICATION OF AMYLOID IN ALZHEIMER'S DISEASE. NAT.STRUCT.MOL.BIOL. vol. 22 pág. 499 (2015).
- [10] A.Petkova,W.Yau,R.Tycko EXPERIMENTAL CONSTRAINTS ON QUATERNARY STRUCTURE IN ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID FIBRILS BIOCHEMISTRY V. 45 498 2006.
- [11] Giulian D, Haverkamp LJ, Yu J, Karshin W, Tom D, Li J, Kazanskaia A, Kirkpatrick J, Roher AE. The HHQK domain of  $\beta$ -amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease, J.BiolChem. 1998, 273(45), 29719-26.
- [12] Winkler K, Scharnagl H, Tisljar U, Hoschützky H, Friedrich I, Hoffmann MM, Hüttinger M, Wieland H, März W. Competition of A $\beta$  amyloid peptide and apolipoprotein E for receptor-mediated endocytosis. J.Lipid Res.1999, 40(3), 447-55.
- [13] SCIENTIFIC REPORTS | 5 : 9649 | DOI: 10.1038/srep09649].
- [14] Yu YZ, Wang WB, Chao A, Chang Q, Liu S, Zhao M, y col. Sorprendentemente redujo la carga de amiloide y mejoró el comportamiento en ratones con enfermedad de Alzheimer inmunizados con vacunas quiméricas recombinantes mediante Ac 1-15 plegable hexavalente fusionado a proteínas transportadoras derivadas de toxinas. J Alzheimer's Dis 2014;41:243-60.
- [15] Wang, HC; Yu, YZ; Liu, S; Zhao, M y Q Xu, Peripherally administered sera antibodies recognizing amyloid- $\beta$  oligomers mitigate Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3 $\times$  Tg-AD mice, Vaccine 2016.
- [16] Zola SM, Manzanares CM, Clopton P, Lah JJ, Levey AI. A behavioral task predicts conversion to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Am J Alzheimer's Dis & other dementia. 2013, 28(2), 179-184.
- [17] Peters SJ y col. Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability, The Journal of Biological Chemistry (2012) 287, 24525-24533.
- [18] Sevigny J y col (2016) The antibody aducanumab reduces AD plaque in Alzheimer's disease. Nature 537: 50-56

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:
  - la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 46;
  - la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 66; y
  - el anticuerpo humanizado se une a los oligómeros beta amiloides.
2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada está codificada por una secuencia de nucleótidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 45; o un codón degenerado u versión optimizada del mismo; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera está codificada por una secuencia de nucleótidos como se establece en la Id. de sec. n.º: 65 o un codón degenerado u versión optimizada del mismo.
3. El anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el anticuerpo humanizado es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un fragmento de unión a anticuerpo, en donde dicho fragmento de unión a anticuerpo se selecciona de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos, preferiblemente en donde el fragmento de unión a anticuerpo es un fragmento Fab.
4. El anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la secuencia CH1 y/o CL o una parte de la misma de IgG4, preferiblemente en donde la secuencia CH1 y/o CL comprende la Id. de sec. n.º: 70 o 72 o una parte de la misma, o una variante conservadora del mismo o una secuencia con al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 89 %, el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 70 y/o 72, preferiblemente en donde el anticuerpo humanizado comprende la Id. de sec. n.º: 70 y/o 72, y/o CH1 y CH2 de la Id. de sec. n.º: 70 o una variante conservadora de cualquiera de los anteriores o una secuencia con al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 89 %, el 90 % o el 95 % identidad de secuencia con cualquiera de los anteriores.
5. El anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de cadena sencilla.
6. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un marcador detectable o agente citotóxico.
7. El anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el inmunoconjugado de la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la demencia con cuerpos de Lewy y/o la angiopatía amiloide cerebral.
8. Una composición que comprende el anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el inmunoconjugado de la reivindicación 6 y un diluyente.
9. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, preferiblemente en donde el ácido nucleico está comprendido en un vector.
10. Una célula que expresa el anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
11. El inmunoconjugado de la reivindicación 6 para uso en la medición de un nivel de beta amiloide in vivo, en un sujeto en riesgo o sospechoso de tener o que tiene la enfermedad de Alzheimer, en donde el anticuerpo está conjugado con un marcador detectable, preferiblemente en donde el marcador es un radionucleido emisor de positrones.
12. Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado o inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 6, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la demencia con cuerpos de Lewy y/o la angiopatía amiloide cerebral en un sujeto que lo necesita.
13. Una cantidad eficaz del anticuerpo humanizado o inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 6, o una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde el anticuerpo humanizado o inmunoconjugado se administra directamente al cerebro u otra porción del SNC.
14. Uso del anticuerpo humanizado o inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 6, o una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo humanizado o inmunoconjugado, para evaluar la

presencia o los niveles de beta amiloide en una muestra biológica de un sujeto a tratar con el anticuerpo humanizado, inmunoconjugado o composición farmacéutica del mismo según las reivindicaciones 1 a 5 o 6.

Figura 1

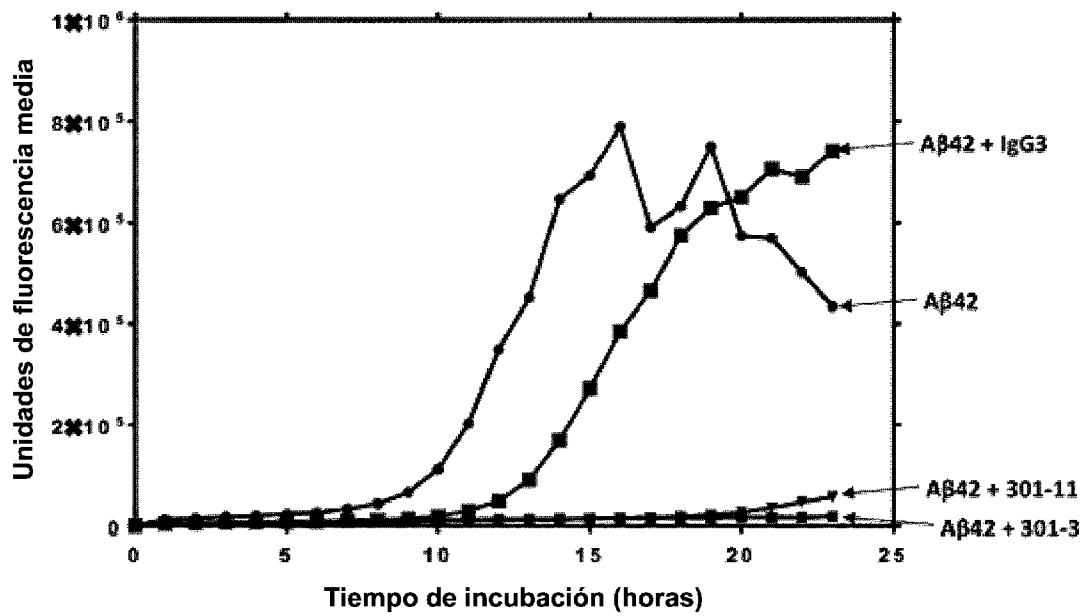
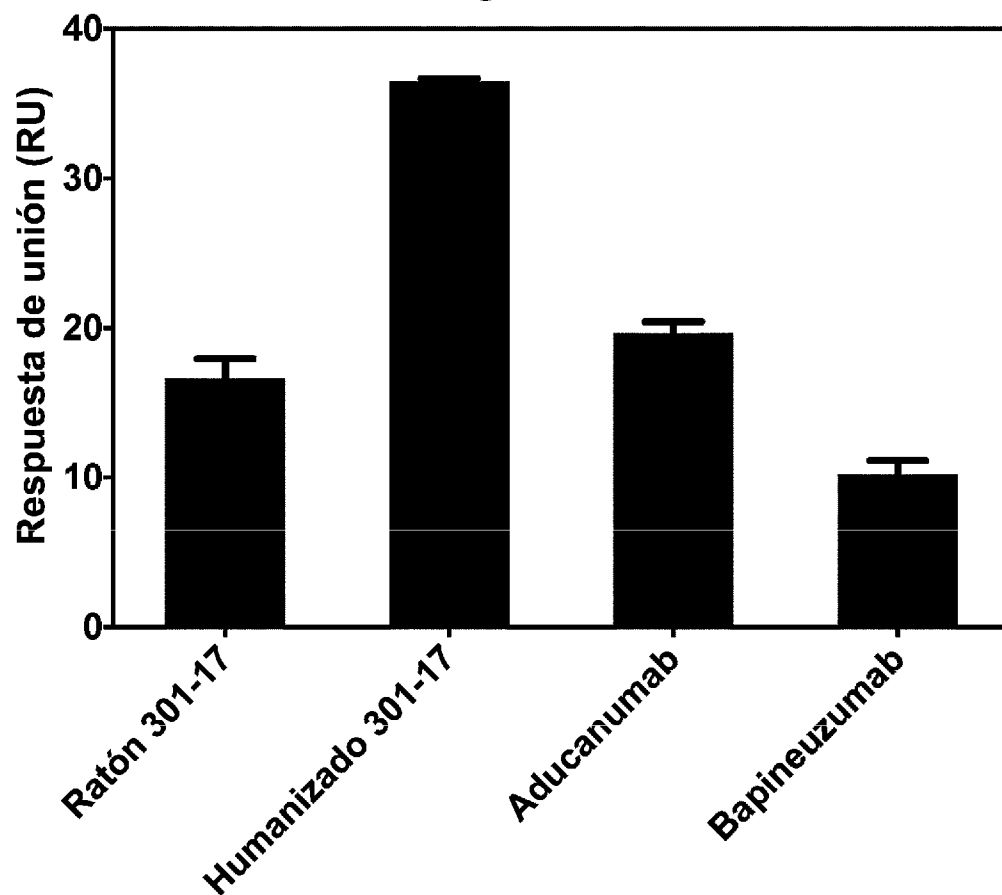
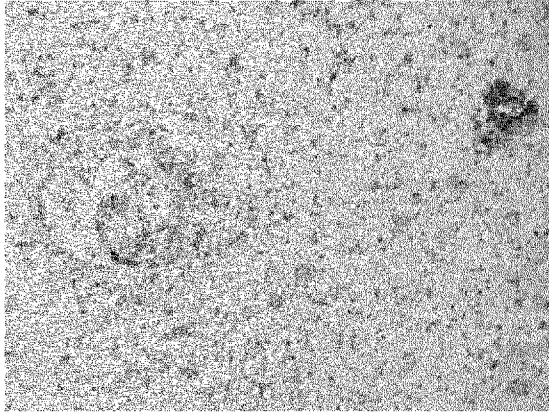


Figura 2

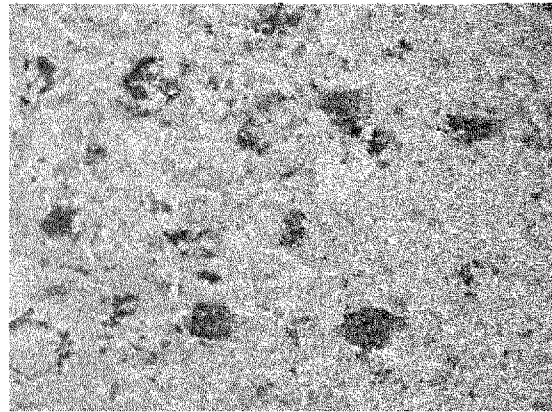




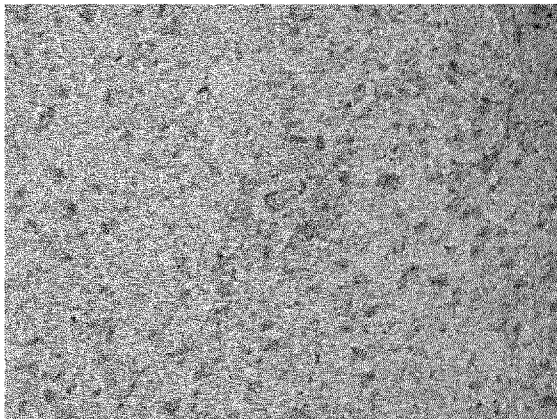
**Figura 3A**  
**Aducanumab**



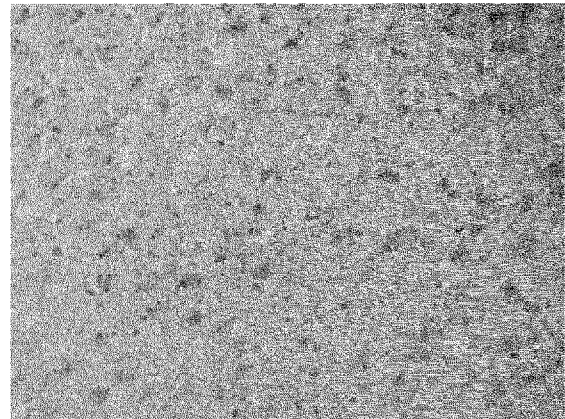
**Figura 3B**  
**Bapineuzumab**



**Figura 3C**  
**Control de isotipo IgG1**



**Figura 3D**  
**Humanizado 301-17**



**Figura 3E**  
**Mu 301-17**



**Figura 3F**  
**Control de isotipo IgG4**

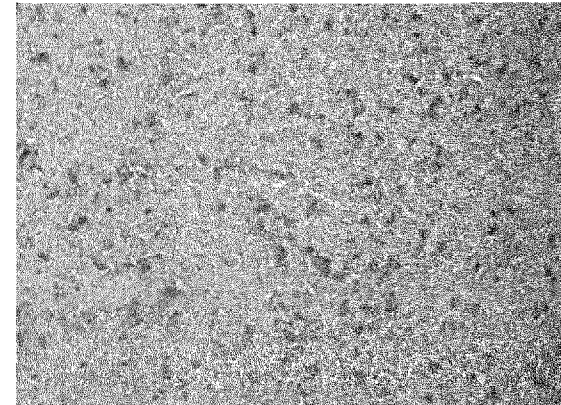


Figura 4a

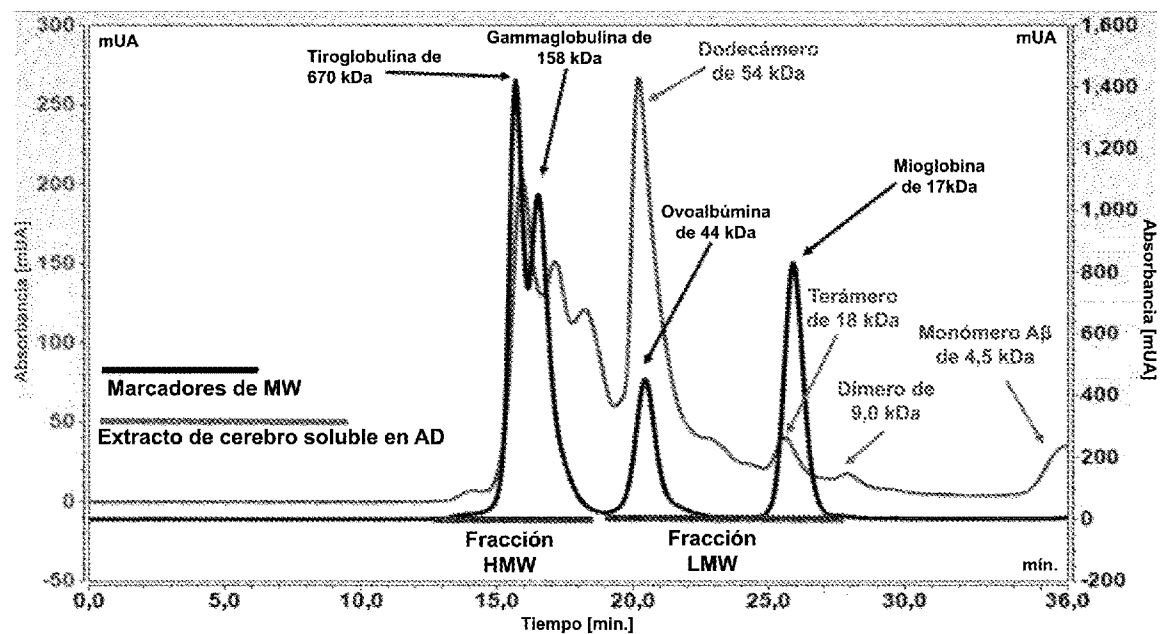


Figura 4b

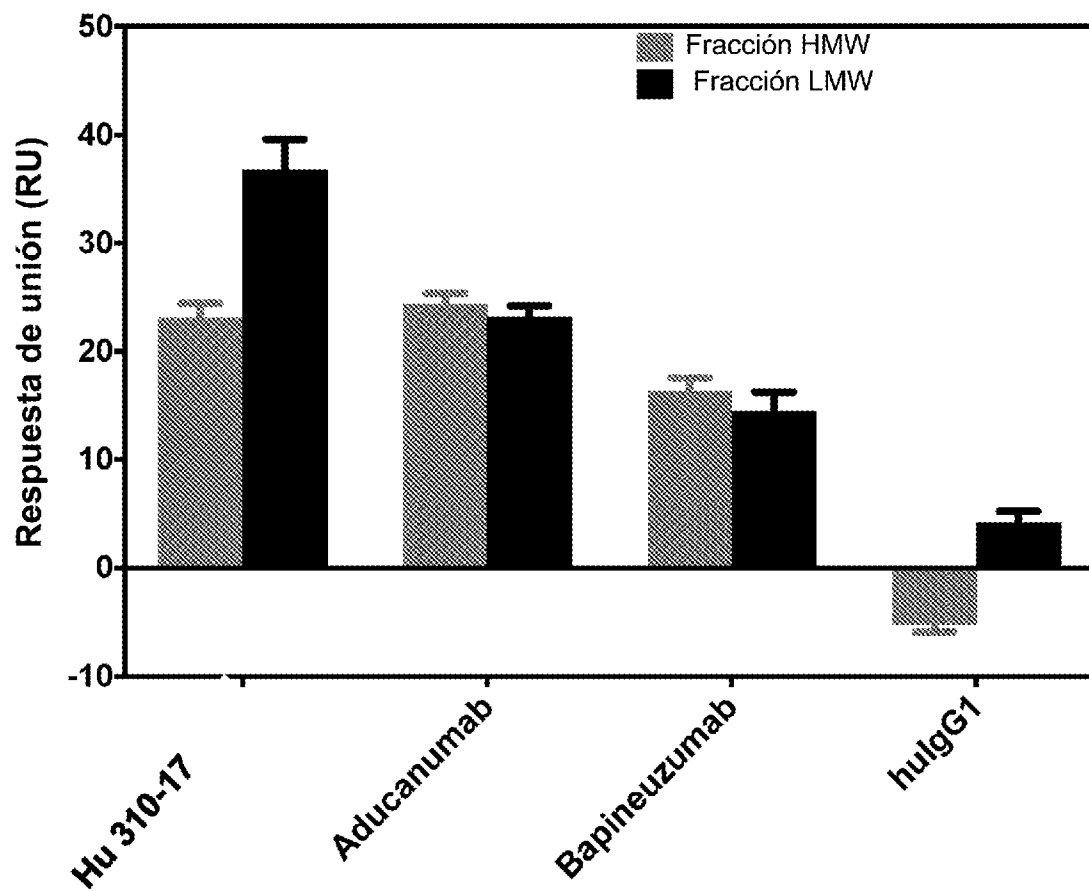


Figura 4c

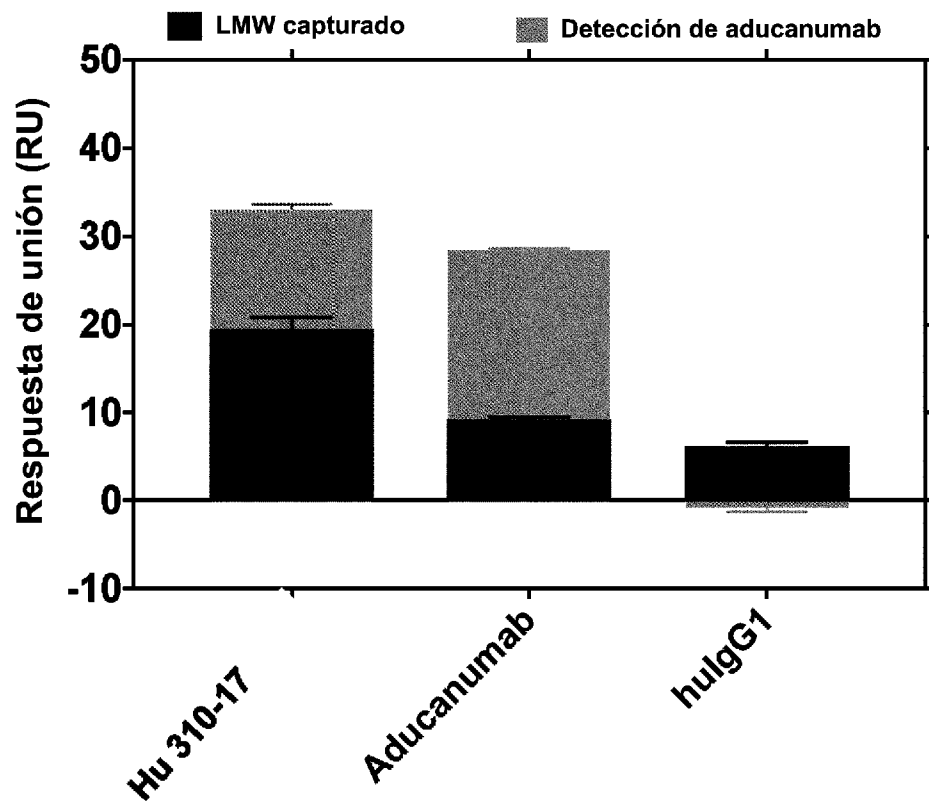
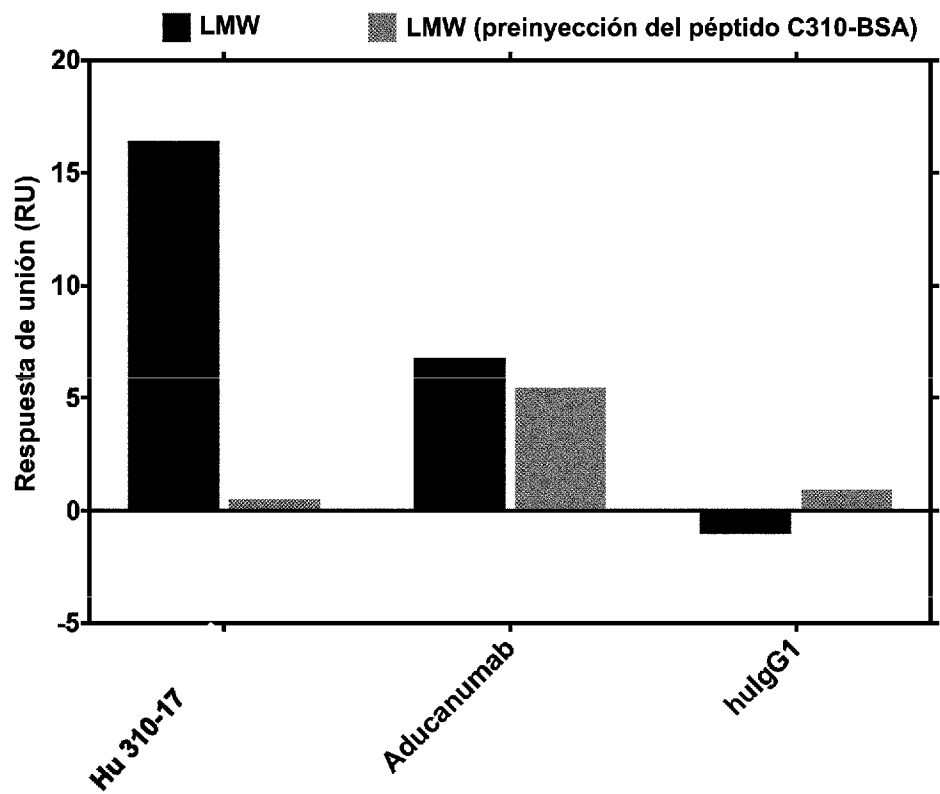
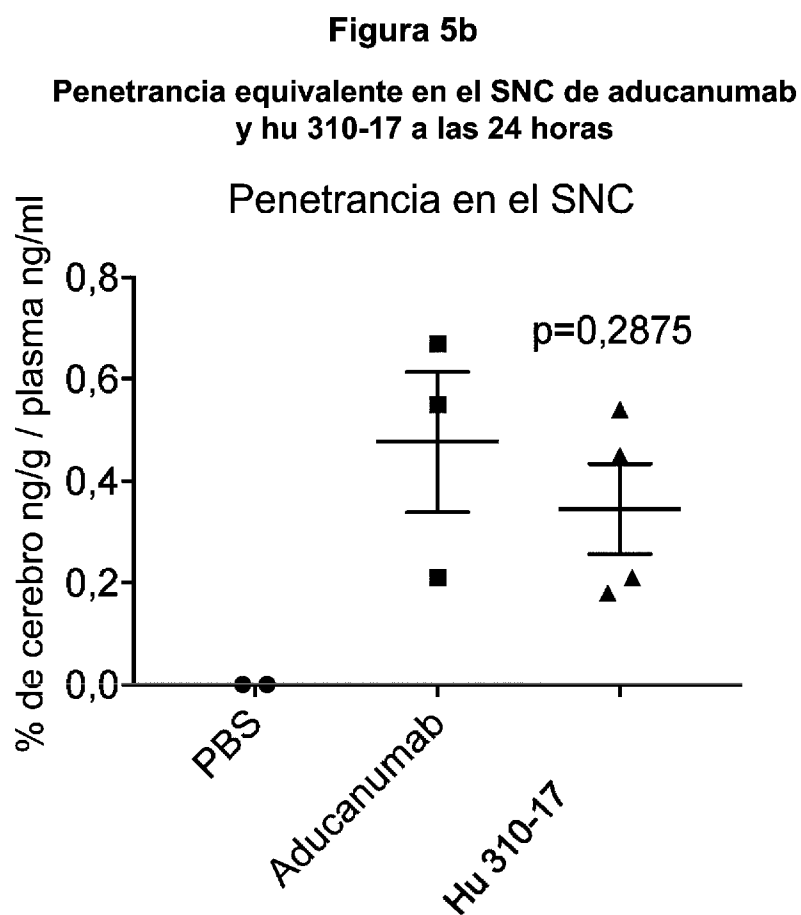
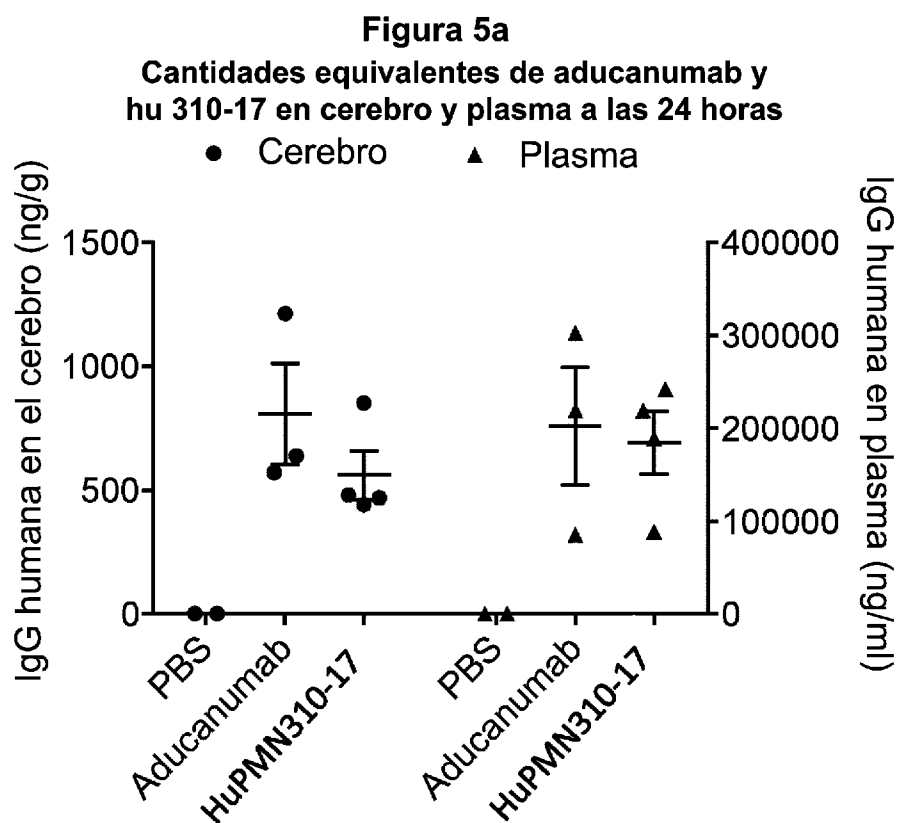


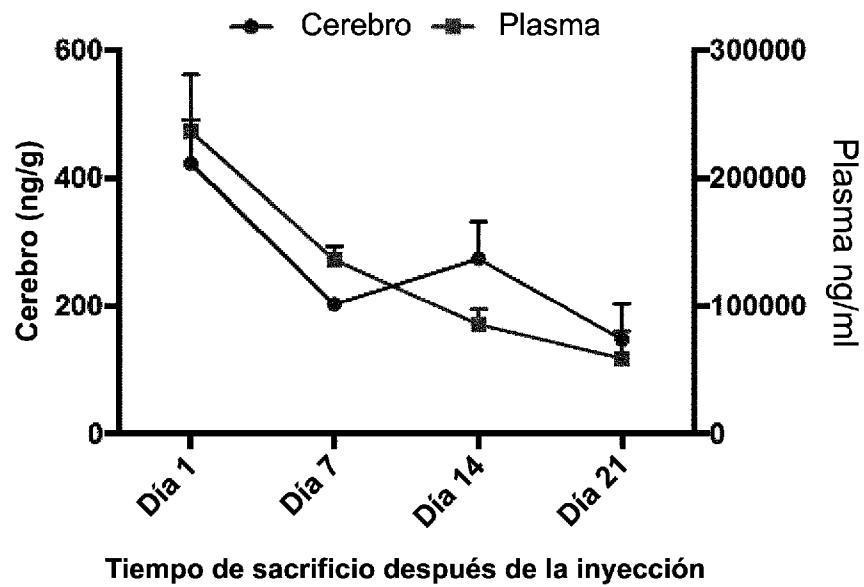
Figura 4d





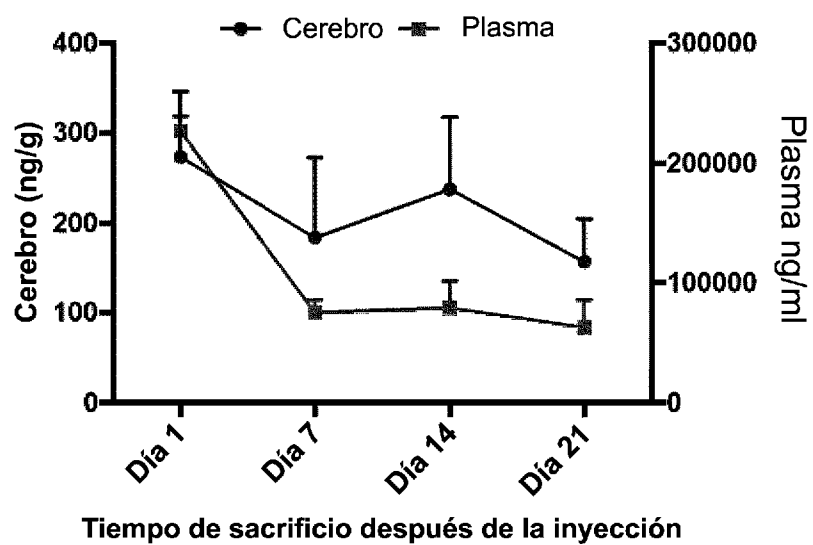
**Figura 5c**

**No Tg**



**Figura 5d**

**APP/PS1**



**Figura 5e**

**Razón cerebro/plasma**

