



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 318 918**

② Número de solicitud: 200500753

⑤ Int. Cl.:  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **01.04.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

Fecha de la concesión: **03.02.2010**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2010**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2010**

⑦ Titular/es:  
**BIOETHERAPIX MOLECULAR MEDICINES, S.L.U.**  
**c/ Marconi, 1 – Parque Tecnológico de Madrid**  
**28760 Tres Cantos, Madrid, ES**

⑧ Inventor/es: **Torán García, José Luis y**  
**Laín de Lera, María Teresa**

⑨ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑩ Título: **Anticuerpos humanos con capacidad de unión al péptido beta-amiloide y sus aplicaciones.**

⑪ Resumen:

Anticuerpos humanos con capacidad de unión al péptido beta-amiloide y sus aplicaciones.

La presente invención hace referencia a anticuerpos monoclonales humanos con capacidad de unión al péptido beta-amiloide y sus aplicaciones. En concreto hace referencia a anticuerpos monoclonales humanos y fragmentos de los mismos con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, a la obtención de dichos anticuerpos y a uso como agentes de terapia y/o diagnóstico en la enfermedad de Alzheimer.

ES 2 318 918 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos con capacidad de unión al péptido beta-amiloide y sus aplicaciones.

5 La presente invención hace referencia a anticuerpos humanos, fragmentos de los mismos o derivados con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, a la obtención de dichos anticuerpos y a su uso como agentes de terapia y/o diagnóstico en la enfermedad de Alzheimer.

**Antecedentes de la invención**

10 La enfermedad de Alzheimer es la causa más frecuente de demencia entre las personas ancianas. Se trata de una alteración neurodegenerativa caracterizada fundamentalmente por la progresiva acumulación de péptido beta-amiloide en áreas del cerebro implicadas en funciones cognitivas, tales como la memoria y el lenguaje. La enfermedad de Alzheimer generalmente afecta a personas mayores, de más de 65 años de edad, aunque también puede presentarse  
15 entre gente más joven. En la actualidad, según los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) la enfermedad de Alzheimer afecta a un 5% de hombres y un 6% de mujeres de más de 60 años en todo el mundo. Cerca de 400.000 personas se encuentran actualmente afectadas en España, más de 8 millones en Europa y, debido al envejecimiento acelerado de la población, está prevista la duplicación del número de enfermos hacia el año 2020 y su triplicación en el año 2050 (Selmes van den Bril, 2003).

20 Numerosos estudios indican que la proteína APP (Proteína Precursora Amiloide), cuya función normal se desconoce, juega un papel esencial en la aparición de la enfermedad. La presencia de placas amiloides causadas por el procesamiento anómalo de la proteína APP constituye un evento central en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Esta proteína es escindida de manera secuencial mediante la acción de alfa, beta y gama-secretasas. En un  
25 proceso patológico, la APP es procesada de manera anómala dando como resultado péptidos insolubles, de 40-42 aminoácidos (péptido beta-amiloide o beta-péptidos), que tienden a agregarse a modo de fibrillas y se depositan como placas en las células neuronales. La acumulación de dichas placas da como resultado la muerte celular de varios tipos de células neuronales con el subsiguiente deterioro cerebral. No obstante, la producción de péptido beta-amiloide a partir del procesamiento de la proteína APP no es el único factor que influye en la existencia de un depósito de beta-péptidos. Existen evidencias de que factores implicados en el catabolismo y la eliminación, así como en la agregación del péptido beta-amiloide, son también críticos (Dodel *et al.*, 2002).

30 A pesar de que en los últimos años se han hecho grandes progresos en cuanto al conocimiento de la etiología, genética y fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, las terapias existentes en la actualidad son de tipo paliativo. La ausencia de fármacos que actúen evitando o bien retrasando significativamente el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer hace que se requieran nuevas terapias alternativas y nuevos principios activos neuroprotectores que permitan reducir el depósito de beta-péptidos y la respuesta inflamatoria, contribuyendo a disminuir la progresión de la enfermedad.

35 El sistema inmune podría jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Estudios de inmunoterapia activa realizados en ratones transgénicos capaces de reproducir la enfermedad de Alzheimer humana (Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 1999) indican que tras la inmunización con péptido beta-amiloide dichos ratones producen anticuerpos específicos capaces de disgregar y reducir las placas amiloides causadas por la acumulación de beta-péptidos, así como de prevenir el desarrollo de nuevas placas y la aparición de los síntomas  
40 asociados. La reducción en el depósito de péptido beta-amiloide observada en dichos ensayos *in vivo*, fue además acompañada de cambios cognitivos en el animal.

45 Los resultados obtenidos en el modelo de ratón motivaron, en el año 2001, el inicio de un ensayo clínico de inmunoterapia activa mediante vacunación en humanos con péptido beta-amiloide 1-42. Tras haber superado la fase I del ensayo clínico sin que fueran observadas reacciones adversas, la fase clínica IIa tuvo que suspenderse a finales del 2002 debido a que un 6% de los individuos vacunados con péptido beta-amiloide desarrollaron encefalitis reactiva (Orgogozo *et al.*, 2003; Munch and Robinson, 2002; Schenk, 2002). Los estudios *post-mortem* efectuados en aquellos individuos que presentaron una respuesta adversa inflamatoria, mostraron además de dichos cambios encefálicos una  
50 reducción en el número de placas amiloides, así como signos de infiltración de linfocitos T en el sistema nervioso central. La respuesta inmune celular inducida por la administración del péptido beta-amiloide es considerada como uno de los factores implicados en la aparición de los efectos adversos observados (Morgan and Gitter, 2004).

55 A pesar de que el ensayo clínico tuvo que ser suspendido, los sujetos participantes en la fase IIa del ensayo continuaron siendo monitorizados (Hock *et al.*, 2002). La mayoría de los individuos vacunados habían desarrollado anticuerpos anti péptido beta-amiloide que reconocían placas amiloides. Se observó que existía una relación inversamente proporcional entre los niveles de anticuerpos anti beta-amiloide en el suero de los sujetos vacunados y la pérdida de facultades intelectuales en dichos individuos (Hock *et al.*, 2003), sugiriendo el papel protector de los anticuerpos anti beta-amiloide frente a la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, se detectó una ausencia de correlación entre los niveles de anticuerpos anti beta-amiloide presentes en suero y la aparición de meningoencefalitis (Orgogozo  
60 *et al.*, 2003).

Una terapia alternativa a la inmunización activa con péptido beta-amiloide para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer es la administración pasiva de anticuerpos específicos anti beta-amiloide. La inmunoterapia

pasiva permite personalizar la dosis de anticuerpo y reemplazar un anticuerpo por otro dirigido a un epítipo distinto, así como elegir el isotipo del anticuerpo a administrar. Otra ventaja de la administración de anticuerpos específicos frente a la inmunización activa, es que su efectividad no depende de que exista una respuesta inmune en el individuo receptor, lo cuál es especialmente interesante en el caso de individuos de edad avanzada ya que los pacientes de este grupo de edad suelen presentar una respuesta inmune variable. Por otra parte, la inmunoterapia pasiva permite detener o bien reducir la dosis de anticuerpo administrada en caso de aparición de reacciones adversas (Morgan *and* Gitter, 2004).

Se han efectuado diversos estudios de inmunoterapia pasiva en ratones transgénicos que reproducen la enfermedad de Alzheimer humana (DeMattos *et al.*, 2001, Bard *et al.*, 2000, Frenkel *et al.* 2000). En dichos estudios se muestra como tras la administración pasiva de anticuerpos con capacidad de unión al péptido beta amiloide existe una reducción del número de placas amiloides, así como una disminución en la progresión de la enfermedad. Dichos resultados sugieren que la respuesta inmune mediada por linfocitos T no es requerida en la eliminación de los depósitos de beta-amiloide, lo que genera una expectativa sobre el potencial terapéutico que ofrece el desarrollo de anticuerpos específicos anti péptido beta-amiloide. Así pues, la administración de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al péptido beta-amiloide produciría efectos positivos similares a los obtenidos mediante inmunización activa. Y a su vez, evitaría la aparición de efectos adversos indeseables, tales como la encefalitis reactiva, en ausencia de una respuesta inmune mediada por linfocitos T.

Los efectos positivos ejercidos por los anticuerpos anti beta-amiloide, observados en los ensayos *in vivo* de inmunoterapia pasiva efectuados en ratones transgénicos, motivaron la realización de diversos trabajos con el objetivo de investigar la presencia de auto-anticuerpos frente al péptido beta-amiloide en humanos sanos no inmunizados y su posible papel protector frente a la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades en las que exista un depósito de péptido beta-amiloide. Sin embargo, dichos trabajos generaron resultados contradictorios.

Por una parte, existen artículos donde se proporcionan datos que dan soporte a un posible papel protector de los anticuerpos anti beta-amiloide. En uno de ellos (Du *et al.*, 2001), se identificó la presencia de anticuerpos (IgG) que reconocen de manera específica el péptido beta-amiloide en humanos no inmunizados, tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo. El título de anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con Alzheimer era significativamente más bajo que el detectado en individuos control. Asimismo, en un estudio posterior (Weksler *et al.*, 2002) observaron que el título de IgG anti beta-amiloide se encontraba reducido en el suero de individuos ancianos enfermos de Alzheimer respecto a individuos sanos de edad avanzada (> 65 años) que no presentaban una pérdida de facultades intelectuales. En ambos trabajos se aportan evidencias a favor del potencial papel protector de la respuesta inmune humoral específica frente al péptido beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer. No obstante, los niveles reducidos de anticuerpos anti beta observados en dichos estudios podrían ser consecuencia de un incremento en la concentración de beta-péptidos en el sistema nervioso central. Así pues, la unión de los beta-péptidos a los autoanticuerpos específicos resultaría en una disminución aparente en la concentración de anticuerpos anti péptido beta-amiloide (Weksler *and* Goodhardt, 2002).

Por otra parte, han sido publicados estudios que contradicen la hipótesis del posible papel protector de los auto-anticuerpos anti beta-amiloide presentes en suero de individuos ancianos no inmunizados. Hyman y colaboradores (Hyman *et al.*, 2001) no hallaron diferencias significativas al comparar los niveles de inmunoglobulinas anti beta-amiloide totales, en suero de pacientes enfermos de Alzheimer, con los niveles detectados en individuos control. En otro estudio reciente (Baril *et al.*, 2004) se compararon los niveles de anticuerpos específicos frente al péptido beta-amiloide en suero de ancianos enfermos de Alzheimer con los de individuos control del mismo rango de edad (casos: 66-86 años, control: 63-82 años). Los individuos de ambos grupos presentaban bajos títulos de anticuerpos anti beta-amiloide, con niveles variables. En dicho estudio también se realizó un análisis de la concentración en suero de IgG anti péptido beta-amiloide 1-42 en diferentes grupos de edad (niños: 1-10 años, jóvenes: 20-48 años y ancianos: sujetos caso y control del estudio). Los resultados de dicho análisis muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de inmunoglobulinas dirigidas frente al péptido beta-amiloide 1-42 entre los diferentes grupos de edad.

Así pues, la consideración del estado de la técnica actual de manera global no permite deducir que exista una relación directa entre la presencia de anticuerpos anti beta-amiloide en suero de individuos sanos no inmunizados y un factor de protección frente al Alzheimer.

En la actualidad, se acepta que el depósito de beta-péptidos en el sistema nervioso central tiene lugar de manera progresiva con la edad y en la enfermedad de Alzheimer. El depósito de péptido beta-amiloide y la formación de placas se inician 10-20 años antes de la aparición de cualquier síntoma indicativo de pérdida de facultades cognitivas que sugiera la presencia de demencia (Monsonogo *et al.*, 2003; Weksler *and* Goodhardt, 2002). Si partimos de esta premisa, los individuos sanos de edad avanzada seleccionados por no presentar ninguna alteración en sus facultades intelectuales, que han formado parte como individuos control en los estudios mencionados, es probable que presentasen depósitos de péptido beta-amiloide y que en un futuro hubieran desarrollado la enfermedad de Alzheimer. Así, el hecho de que individuos de edad avanzada no presenten síntomas de demencia no excluye que dichos ancianos en un futuro desarrollen la enfermedad. En un estudio de cohortes realizado en voluntarios sanos (Kawas *et al.*, 2000) se efectuó un seguimiento de la evolución de los individuos participantes, de manera biennial, con el objetivo de determinar la tasa de incidencia de la enfermedad de Alzheimer para distintos rangos de edad. En dicho estudio se observó que la tasa de incidencia aumenta con la edad, desde un 0.08% por año para el rango de edad comprendido entre los 60 y 65 años hasta un 6.48% por año en el grupo de individuos de más de 85 años, considerando los datos de hombres y mujeres combinados, estimándose que en aproximadamente 4.4 años la tasa de incidencia se duplica.

Nuestro grupo de investigadores procedió a la búsqueda e identificación de individuos sanos longevos de más de 90 años de edad que presentaran plenas facultades cognitivas y buena salud en ausencia de síntomas de Alzheimer u otra neuropatía y que nunca hubieran recibido ningún tipo de medicación para la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, es decir, se escogieron como candidatos para la obtención de anticuerpos anti péptido beta-amiloide 1-42 un grupo restringido de individuos los cuales han superado los años considerados como críticos en la aparición de la enfermedad de Alzheimer. Así pues, se seleccionaron un grupo de ancianos nonagenarios sanos en los cuales, en ausencia de inmunización, se analizó la presencia en suero de anticuerpos anti péptido beta-amiloide 1-42 mediante la realización de inmunoensayos específicos, detectándose la existencia de anticuerpos frente al péptido beta-amiloide 1-42.

La presente invención hace referencia a anticuerpos monoclonales recombinantes humanos anti péptido beta-amiloide 1-42 y a su obtención mediante el aislamiento, clonaje y expresión de genes de inmunoglobulinas aislados a partir de una porción representativa del repertorio genético de inmunoglobulinas de donantes humanos nonagenarios sanos escogidos selectivamente por poseer plenas facultades cognitivas y no presentar síntomas de Alzheimer u otra neuropatía.

Sorprendentemente, dos de los anticuerpos de la invención presentan numerosas mutaciones somáticas en su secuencia nucleotídica en comparación con los genes genómicos correspondientes (*germ line*), indicando la existencia de procesos de maduración antigénica frente al péptido beta-amiloide 1-42. Estos hechos indican una respuesta inmune competente frente al péptido beta y reflejan la existencia de anticuerpos naturales anti beta amiloide, los cuales no presentan efectos nocivos en pacientes sanos longevos, con potencial aplicación terapéutica en la enfermedad de Alzheimer.

### Explicación de la invención

La presente invención hace referencia a anticuerpos, a fragmentos funcionales de los mismos o derivados con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42 y a su obtención mediante técnicas de ingeniería genética a partir del repertorio genético de inmunoglobulinas aislado de donantes humanos sanos nonagenarios. En particular hace referencia a anticuerpos, a fragmentos funcionales de los mismos o derivados con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, a las secuencias de ácido nucleico que codifican para dichos anticuerpos, así como a los usos de los mismos.

Los anticuerpos *per se* son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Los anticuerpos están constituidos estructuralmente por dos proteínas distintas denominadas cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC), las cuales están unidas mediante puentes disulfuro. Ambas poseen una región variable (V) y una región constante (C). Las regiones variables están implicadas en el reconocimiento del antígeno, mientras que la región constante de la HC determina el isotipo del anticuerpo y las propiedades funcionales del mismo. Al comparar la similitud de secuencia de los distintos dominios de una molécula de anticuerpo, se ha observado que la mayoría de dominios pertenecientes a anticuerpos de la misma subclase presentan la misma secuencia. Dichos dominios se denominan dominios constantes (C). CL es el dominio constante de la cadena ligera y los dominios constantes de la cadena pesada son CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. Sin embargo, un dominio de cada una de las cadenas es variable (VH y VL). Kabat y colaboradores (Kabat *et al.*, 1978) observaron que la variabilidad se encuentra concentrada en 3 regiones de los dos dominios variables. Dichas regiones hipervariables o CDRs (*Complementary-Determining Regions*) interaccionan de manera tridimensional para dar lugar al sitio de unión al antígeno, el cuál contiene seis regiones CDR, tres del dominio VH y tres del dominio VL. Distintos autores han observado que el CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) es la región que presenta un mayor grado de variabilidad y una participación predominante en la interacción antígeno-anticuerpo.

Los genes que codifican las cadenas HC y LC están localizados en distintos cromosomas, formando en cada caso familias multigénicas. Los genes que codifican las regiones variables y constantes de las HC y LC se hallan separados en el genoma, por consiguiente para su expresión es necesario que se produzca primero la recombinación somática de los mismos (Tonegawa, 1983). La región variable de la cadena pesada es codificada por tres segmentos génicos: Variabilidad (V), Diversidad (D) y Unión (J) mientras que la región variable de la cadena ligera se compone por dos segmentos génicos: V y J. Cada uno de estos segmentos consta de un número variable de genes que se agrupan en familias según su grado de homología (Williams *and* Winter, 1993; Zachau, 1993). Los segmentos de la región constante de las cadenas pesadas y ligeras se hallan próximos a los segmentos J y son incorporados al complejo V (D)J mediante splicing del ARN (Early *et al.* 1980). La existencia de múltiples copias de cada uno de los segmentos génicos que componen las HC y las LC, así como las diversas posibilidades de combinación entre ellos, contribuyen a generar la diversidad del repertorio de anticuerpos.

La recombinación somática de los segmentos V(D)J ocurre durante el proceso de maduración de los linfocitos B. Tanto la adición de nucleótidos N por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), como delecciones causadas por exonucleasas o la inserción de elementos palindrómicos, generados durante la resolución de los productos recombinantes, contribuyen a la variabilidad de la región determinante de complementariedad (HCDR3). Dicha región está implicada de manera directa en el reconocimiento antigénico y contribuye a la diversidad del repertorio de inmunoglobulinas. Posteriormente, el repertorio de anticuerpos es diversificado durante la respuesta antigénica del linfocito maduro mediante mutación somática. Este proceso implica la introducción de mutaciones puntuales en los genes de las regiones variables de ambas cadenas HC y LC generando variables intraclonales. Las mutaciones más frecuentes son transiciones, que conllevan sustituciones en la secuencia de aminoácidos dando como resultado la aparición de

## ES 2 318 918 B1

nuevas variantes de la inmunoglobulina original. Comienza entonces, un proceso selectivo dirigido por antígeno que va enriqueciendo poblaciones de linfocitos B con inmunoglobulinas de mayor afinidad (y quizás también de mejor cinética). Este fenómeno es lo que se conoce como maduración de la afinidad. En los clones seleccionados, el análisis de las mutaciones somáticas de las cadenas variables de las inmunoglobulinas muestra que, en general, los cambios tienden a concentrarse en las regiones determinantes de complementariedad (Foote *and* Milstein, 1991).

En el marco de la presente invención, se entiende como repertorio genético de inmunoglobulinas el conjunto de segmentos génicos de inmunoglobulinas que una vez reordenados codifican para la síntesis de anticuerpos.

Un primer aspecto de la invención hace referencia a un procedimiento de obtención de anticuerpos, fragmentos de los mismos o derivados con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, mediante técnicas de ingeniería genética a partir del repertorio genético de inmunoglobulinas aislado de donantes humanos sanos nonagenarios.

Los anticuerpos de origen murino presentan problemas para pasar a fase clínica ya que los anticuerpos de ratón son inmunogénicos en humanos y normalmente desencadenan una respuesta inmune generando anticuerpos humanos anti anticuerpos de ratón (HAMA). Dichas inmunoglobulinas reconocen los anticuerpos terapéuticos e impedirán que éstos alcancen su diana, además pueden desencadenar una reacción de hipersensibilidad de tipo III (George *and* Urch, 2000). Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos recombinantes de origen humano, minimizando las posibilidades de que se produzca rechazo por parte del sistema inmune del individuo receptor.

Un aspecto preferido de la invención, hace referencia al clonaje y expresión del repertorio genético de inmunoglobulinas aislado de donantes humanos nonagenarios sanos escogidos selectivamente por poseer plenas facultades cognitivas y no presentar síntomas de Alzheimer u otra neuropatía, en cuyo suero se detectó la presencia de anticuerpos anti péptido beta-amiloide 1-42.

Existen distintas estrategias para la producción de anticuerpos monoclonales. La tecnología de los hibridomas (Kennet, McKearn *and* Bechtol, 1980) supuso una revolución para la investigación en inmunología, permitiendo la producción de anticuerpos consecuencia de la actividad de síntesis de un único clon de linfocitos B. Los recientes avances en ingeniería genética han facilitado en gran medida la producción, identificación y conjugación de fragmentos de anticuerpos recombinantes. Un aspecto aún más preferido de la invención hace referencia a la construcción de una librería que contenga el repertorio genético de inmunoglobulinas aislado de donantes humanos nonagenarios sanos escogidos selectivamente por poseer plenas facultades cognitivas y no presentar síntomas de Alzheimer u otra neuropatía, en cuyo suero se detectó la presencia de anticuerpos anti péptido beta-amiloide 1-42. Dicha librería de genes de anticuerpos debe, preferiblemente, ser ampliamente representativa del repertorio genético de inmunoglobulinas y puede ser obtenida, por ejemplo, mediante amplificación por PCR del cDNA de linfocitos B. Preferiblemente, el método de selección de esta librería debe tener una eficiencia comparable a la del sistema inmune, lo que se puede conseguir exponiendo en la superficie de microorganismos los anticuerpos producidos (Little *et al.*, 1994). Algunos ejemplos de microorganismos que pueden ser empleados son: fagos filamentosos como M13 (McCafferty *et al.*, 1990), bacterias como *E. coli* (Fuchs *et al.*, 1991) o levaduras (Boder *and* Wittrup, 1997). En la estrategia de presentación en superficie existe un vínculo físico entre la capacidad de unión al antígeno y el gen que codifica para dicho anticuerpo. El anticuerpo presentado en la superficie celular o de la cápside viral es codificado en el material genético del clon seleccionado, de forma que la afinidad por el antígeno permite aislar el microorganismo portador del gen del anticuerpo de interés. En el marco de la presente invención, se entiende como anticuerpo de interés aquel anticuerpo con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42. Otra estrategia de presentación al antígeno de los anticuerpos de la librería es el *Ribosome Display* (Hanes J *and* Pluckthun A., 1997), en el que el DNA es transcrito a mRNA, el cual es purificado y traducido *in vitro*. La traducción *in vitro* del mRNA es diseñada de tal manera que se impide la disociación del complejo mRNA-ribosoma-péptido. Así pues, dichos complejos serán utilizados para la selección por afinidad frente al antígeno de aquellos clones que codifican el anticuerpo de interés.

El proceso de selección antigénica consiste en la identificación de aquellos clones que presentan afinidad por el antígeno y el posterior enriquecimiento de la librería en dichos clones, mediante amplificación en *E. coli* u otro organismo adecuado. Dicha selección ("Bio-panning") puede realizarse mediante distintas estrategias que incluyen, pero no se limitan a: la selección mediante el uso de antígenos inmovilizados por métodos tales como ELISA, inmunotubos, columnas de afinidad o chips de sensores BIAcore; la selección mediante el uso de antígenos en solución, como por ejemplo: antígenos biotinilados y la selección por marcadores expresados en la superficie celular, tanto en monocapas de células adherentes como en células en suspensión. Generalmente, en el proceso de selección antigénica es necesario realizar varios ciclos de selección. Tras la selección antigénica de las librerías construidas, es habitual llevar a cabo la obtención de clones de anticuerpos específicos contra las moléculas selectoras. La evaluación de su especificidad antigénica puede, por ejemplo, realizarse mediante inmunoensayo enzimático.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42.

Un aspecto preferido de la invención se refiere a un anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42 obtenido mediante técnicas de ingeniería genética a partir del repertorio genético de inmunoglobulinas aislado de donantes humanos nonagenarios sanos.

## ES 2 318 918 B1

En el marco de la presente invención, se entiende como fragmento funcional de anticuerpo aquellos fragmentos de anticuerpo que pueden ser obtenidos mediante la tecnología del ADN recombinante y conservan la capacidad de unión al antígeno. Como fragmentos funcionales de anticuerpo se incluyen fragmentos de una molécula de anticuerpo IgG tales como Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>. También se incluyen fragmentos Fv y derivados de éstos tales como scFv (single-chain Fv) y dsFv (disulfide-stabilized Fv), que han sido modificados para aumentar la estabilidad del fragmento Fv recombinante. La unión de dos moléculas distintas de scFv dará lugar a scFv biespecíficos. Otros fragmentos funcionales muy similares a los scFv biespecíficos, son los denominados diabodies. Los diabodies son fragmentos de anticuerpos que consisten en dos cadenas asociadas, donde cada una de las cadenas comprende un dominio variable de la cadena ligera o pesada unida a un espaciador. Cambios en la longitud de dicho espaciador dirigen la formación de diabodies, triabodies o tetrabodies. Asimismo, han sido también descritos otros fragmentos funcionales basados en fragmentos scFv, tales como los minibodies, los cuales son fragmentos de anticuerpo bivalentes formados por la unión de dos moléculas del péptido de fusión scFv-CH<sub>3</sub>. Se entienden también como fragmentos funcionales de anticuerpo, fragmentos Fd *like* (Chamow and Ashkenazy, 1999), *domain antibodies* (Holt *et al.*, 2003) y otros fragmentos de anticuerpo obtenidos por ingeniería genética que por sí solos sean capaces de interactuar con el antígeno.

En el marco de la presente invención, se entiende como derivado cualquier molécula que comprenda un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo en su estructura. Por ejemplo: inmunoconjugados, entendiéndose como tales moléculas formadas por un anticuerpo o un fragmento funcional de anticuerpo y una molécula efectora.

Una realización particular de la presente invención se refiere a un anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta- amiloide 1-42 que comprende una o más de las secuencias seleccionadas de entre el grupo constituido por: la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 2 que corresponde a la cadena pesada del anticuerpo AD38 (Figura 8), la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 4 que corresponde a la cadena ligera de AD38 (Figura 9) o secuencias homólogas a éstas.

El anticuerpo AD38 de la presente invención se encuentra definido en la secuencia nucleotídica SEQ ID NO 9, cuya secuencia aminoacídica correspondiente viene definida en la SEQ ID NO 10, en adelante nos referiremos a dicho anticuerpo como AD38.

En el marco de la presente invención se entiende como secuencias homólogas aquellas secuencias aminoacídicas que presentan un grado de similitud de al menos un 80% con las secuencias aminoacídicas de los anticuerpos de la presente invención. Preferentemente, aquellas que presentan un grado de similitud de al menos un 85%. Más preferentemente, aquellas que presenten un grado de similitud de al menos un 90% con las secuencias aminoacídicas de los anticuerpos de la presente invención y aún más preferentemente aquellas secuencias aminoacídicas que presenten un grado de similitud de al menos un 95%. Los algoritmos para el análisis de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST, descrito en Altschul *et al.*, 1990.

En una realización particular preferida, el anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42 comprende al menos una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 2 y la cadena ligera comprende la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 4.

En una realización particular aún más preferida se hace referencia a un fragmento funcional de anticuerpo con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1- 42 que comprende al menos una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada consiste en la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 2 y la cadena ligera consiste en la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 4. Como por ejemplo, el anticuerpo recombinante de cadena sencilla (scFv) AD38 (SEQ ID NO 10).

Otra realización particular de la presente invención se refiere a un anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta- amiloide 1-42 que comprende una o más de las secuencias seleccionadas de entre el grupo constituido por: la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 6 que corresponde a la cadena pesada del anticuerpo AD64 (Figura 10); la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 8 que corresponde a la cadena ligera de AD64 (Figura 11) o secuencias homólogas a éstas.

El anticuerpo AD64 de la presente invención se encuentra definido en la secuencia nucleotídica SEQ ID NO 11, cuya secuencia aminoacídica correspondiente viene definida en la SEQ ID NO 12, en adelante nos referiremos a dicho anticuerpo como AD64.

En una realización particular preferida, el anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, comprende al menos una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende la secuencia SEQ ID NO 6 y la cadena ligera comprende la secuencia SEQ ID NO 8.

En una realización particular aún más preferida se hace referencia a un fragmento funcional de anticuerpo con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42 que comprende al menos una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada consiste en la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 6 y la cadena ligera consiste en la secuencia aminoacídica definida en la SEQ ID NO 8. Como por ejemplo, el anticuerpo recombinante de cadena sencilla (scFv) AD64 (SEQ ID NO 12).

## ES 2 318 918 B1

Otra realización particular hace referencia a un anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, obtenido mediante estrategias de maduración de la afinidad a partir de los anticuerpos de la presente invención. Dichas estrategias de maduración de la afinidad, incluyen pero no se limitan a: *chain shuffling* (Marks *et al.*, 1992), introducción de mutaciones dirigida (Balint *and* Larrick, 1993) o estrategias de mutación al azar.

En el marco de la presente invención se entiende como fragmento scFv un polipéptido recombinante en el que las secuencias de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada (VL y VH) de un anticuerpo han sido enlazadas mediante una secuencia artificial. Así, por ejemplo, el extremo C-terminal de la secuencia de VH es enlazado con el extremo N-terminal de la secuencia de VL mediante un péptido de unión. La disposición de los dominios variables influirá sobre las características del scFv. Los fragmentos scFv presentan una serie de ventajas respecto a anticuerpos intactos y a otros fragmentos funcionales de anticuerpo:

- a. Los fragmentos scFv carecen de la región Fc y por tanto se evita la unión no deseada del anticuerpo a células que presentan unión a Fc, tales como las células del sistema retículo-endotelial, así como la fijación del complemento. La ausencia de la región Fc supone una ventaja en determinadas aplicaciones tales como inmunoterapia dirigida e imagen molecular.
- b. Debido a su bajo peso molecular los fragmentos scFv presentan una rápida biodistribución, accediendo a los tejidos con mayor facilidad que los anticuerpos intactos y otros fragmentos funcionales.
- c. La eliminación plasmática de los fragmentos scFv es más rápida que la observada en fragmentos Fab y en anticuerpos intactos. Gracias a la mayor tasa de eliminación de los scFv, los inmunocomplejos formados por scFv conjugados con principios activos o radionucleótidos, presentan una menor toxicidad.
- d. Debido a su menor tamaño, la retención de complejos antígeno-anticuerpo de fragmentos scFv en el glomérulo renal es menor a la observada en fragmentos Fab y en anticuerpos intactos.
- e. Los fragmentos scFv son fragmentos funcionales altamente versátiles ya que son fácilmente modificados mediante ingeniería genética. A partir de un fragmento scFv es posible generar otros fragmentos funcionales.

Otra realización particular hace referencia a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado que comprenda parte de cualquiera de las secuencias aminoacídicas definidas en las secuencias SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8 o combinaciones, de parte o la totalidad de la secuencia de éstas, el cuál mantenga la capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42.

En una realización particular preferida se entienden como parte de cualquiera de las secuencias aminoacídicas definidas en las secuencias SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 8, los CDR1, CDR2 o CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo AD38 definidos en la Figura 8, los CDR1, CDR2 o CDR3 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo AD38 definidos en la Figura 9, los CDR1, CDR2 o CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo AD64 definidos en la Figura 10, así como los CDR1, CDR2 o CDR3 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo AD64 definidos en la Figura 11.

Un tercer aspecto de la invención hace referencia a una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia aminoacídica del dominio variable de la cadena ligera o de la cadena pesada de un anticuerpo con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42 de la presente invención, así como a variantes de dicha molécula de ácido nucleico.

En el marco de la presente invención, se entiende como variantes de una molécula de ácido nucleico secuencias substancialmente similares. Secuencias substancialmente similares incluyen secuencias nucleotídicas que debido a la degeneración del código genético codifican la secuencia aminoacídica del dominio variable de la cadena ligera o de la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención. Los aminoácidos son codificados por tripletes constituidos por tres nucleótidos, también denominados codones. La mayoría de aminoácidos son codificados por más de un triplete. A este hecho se le denomina degeneración del código genético. Así, uno o más tripletes pueden ser reemplazados por otros tripletes, pero dicha secuencia nucleotídica continuará codificando para un mismo aminoácido.

Secuencias substancialmente similares también incluyen secuencias nucleotídicas que codifican variantes de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención. Estas secuencias nucleotídicas homólogas a una secuencia nucleotídica particular de la presente invención tendrán al menos un 40%, 50%, 60%, 70% de identidad con dicha secuencia. Preferiblemente, al menos un 75%, 80%, 85%, 90% de identidad con dicha secuencia. Aún más preferiblemente, tendrá una similitud de secuencia de un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor.

Un aspecto preferido de la invención hace referencia a una molécula de ácido nucleico que comprende cualquiera de las secuencias nucleotídicas mostradas en la SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 7; o cualquier combinación de éstas.

Un cuarto aspecto de la invención hace referencia a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Dicho vector incluye pero no se limita a: plásmidos, cósmidos y vectores virales.

## ES 2 318 918 B1

Dichos vectores, preferentemente contienen una o más regiones reguladoras, tales como promotores, secuencias señal de terminación y secreción que permitan que las moléculas de ácido nucleico de la presente invención sean expresadas como una proteína. Aún más preferentemente, dicho vector es un vector viral que puede utilizarse para infectar células *in vitro* o *in vivo*. Dicho vector puede ser utilizado en terapia génica.

Un quinto aspecto de la invención hace referencia a una célula hospedadora que contenga al menos un vector que comprenda una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Dichas células hospedadoras son células conocidas por cualquier experto en la materia, éstas incluyen pero no se limitan a: células de mamífero, células de levaduras y células procariotas como *Escherichia coli*.

Un sexto aspecto de la invención hace referencia al uso de un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado de la presente invención, para la elaboración de una composición farmacéutica.

Un aspecto preferido de la invención hace referencia a una composición farmacéutica que contenga un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado, de la presente invención.

Un aspecto más preferido de la invención hace referencia a una composición farmacéutica que contenga un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado, de la presente invención, para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

Un séptimo aspecto de la invención hace referencia al uso de un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado de la presente invención, para la detección del péptido beta-amiloide 1-42 *in vitro*. Resulta de particular interés el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. La producción de anticuerpos monoclonales específicos resultará evidente para cualquier experto medio en la materia. El uso de anticuerpos específicos en técnicas de inmunodetección *in vitro* es asimismo ampliamente conocido. Dichas técnicas incluyen pero no se limitan a: ELISA, Western Blot, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o citometría de flujo.

Un octavo aspecto de la invención hace referencia al uso de un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado de la presente invención, para la detección del péptido beta-amiloide 1-42 *in vivo*. La detección *in vivo* del péptido beta-amiloide 1-42 puede llevarse a cabo mediante técnicas de imagen molecular. Anticuerpos monoclonales marcados constituyen contrastes específicos, detectables en función de la presencia de unión a su ligando (Weissleder, 2002). Las técnicas de imagen molecular permiten realizar estudios de detección específica *in vivo*. En experimentación animal permite estudiar la evolución de una patología o el efecto de un fármaco en el mismo animal sin que sea necesario sacrificarlo. En los seres humanos permite el estudio farmacológico o de la patología en diferentes tejidos de forma no invasiva y prácticamente indolora. El uso de un anticuerpo marcado que se una específicamente al péptido beta-amiloide 1-42 permitiría detectar de forma muy temprana (antes de la aparición de los síntomas clínicos característicos de la enfermedad de Alzheimer) la presencia de depósitos de péptido beta-amiloide 1-42, así como el estudio de la evolución de la enfermedad en el tiempo y de la eficiencia del tratamiento.

Un noveno aspecto de la invención hace referencia al uso de un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado de la presente invención, para la identificación de un compuesto capaz de competir con dicho anticuerpo, fragmento o derivado por la unión al péptido beta amiloide 1-42.

En un aspecto preferido de la invención, dicho compuesto capaz de competir con el anticuerpo, fragmento o derivado de la presente invención es un péptido o un peptidoide. En el marco de la presente invención, se entiende como peptidoide a un compuesto análogo a un péptido en el que los enlaces peptídicos han sido reemplazados por enlaces pseudopeptídicos, como por ejemplo: Carba [psi] (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), Depsi [psi] (CO-O), Hidroxietileno [psi] (CHOH-CH<sub>2</sub>), Cetometileno [psi] (CH-CH<sub>2</sub>), Metileno-oxy CH<sub>2</sub>-O-, Reducido CH<sub>2</sub>-NH, Tiometileno CH<sub>2</sub>-S-, Tiopéptido CS-NH, N-modificado -NRCO-.

En un aspecto aún más preferido de la invención, dicho compuesto capaz de competir con el anticuerpo, fragmento o derivado de la presente invención es un mimotopo. En el marco de la presente invención, se entiende como mimotopo a una molécula peptídica cuya estructura imita la del epítipo reconocido por los anticuerpos, fragmentos o derivados de la presente invención. La secuencia aminoacídica de dicho mimotopo no tiene porque guardar similitud de secuencia con el epítipo, no obstante el mimotopo adoptará una conformación que imita la del epítipo (Steward *et al.*, 1995).

En un aspecto especialmente preferido de la invención, dicho compuesto capaz de competir con el anticuerpo, fragmento o derivado de la presente invención es un péptido sintético basado en la secuencia de la región CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1D ilustran los resultados obtenidos en los ensayos ELISA realizados utilizando como tapiz el péptido beta-amiloide 1-42 a una concentración de 5 µg/ml y anti IgG+IgM+IgA-HRP como anticuerpo secundario, para detectar la existencia de anticuerpos anti péptido beta-amiloide 1-42 en el suero de los donantes Vj2, Vj3, Vj4 y Vj5. En el eje X se muestran las diluciones seriadas de suero ensayadas y en el eje Y la densidad óptica a 450 nm.

## ES 2 318 918 B1

Las figuras 2A y 2B ilustran los resultados obtenidos en los ensayos ELISA utilizando como tapiz el péptido beta-amiloide 1-42 a una concentración de (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y anti IgG (H+L)-HRP como anticuerpo secundario, frente a distintas diluciones de los sueros Vj2 y Vj5. En el eje X se muestran las diluciones seriadas de suero ensayadas y en el eje Y la densidad óptica a 492 nm. La figura 2A muestra la curva de titulación del suero del donante Vj2 y la figura 2B la curva de titulación del suero del donante Vj5.

Las figuras 3A y 3B muestran la fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos en la primera amplificación del repertorio genético de inmunoglobulinas humanas para la construcción de una librería de fragmentos de anticuerpos (Fab). En la figura 3A se muestran las cadenas pesadas gamma 1 y en la figura 3B las cadenas kappa. La figura 3C muestra la fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos en la segunda amplificación utilizando como molde los productos de PCR purificados de la primera amplificación.

Las figuras 4A y 4B muestran la fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos en la primera amplificación del repertorio genético de inmunoglobulinas humanas para la construcción de una librería de fragmentos de cadena sencilla (scFv). En la figura 4A se muestran las cadenas kappa y en la figura 4B las cadenas pesadas gamma. La figura 4C muestra la fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos en la segunda amplificación, realizada por triplicado, utilizando como molde los productos de PCR purificados de la primera amplificación.

La figura 5 muestra las secuencias HCDR3 de varios clones escogidos al azar de la librería de fragmentos de anticuerpo (Fab) y de la librería de fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv), los cuales han sido secuenciados con el objetivo de comprobar la diversidad de las librerías obtenidas.

La figura 6 muestra el grado de enriquecimiento obtenido en el paso de selección antigénica de la librería de fragmentos de cadena sencilla frente al péptido amiloide beta 1-42 inmovilizado en fase sólida (ELISA). La gráfica representa el progreso de cada ciclo de selección como porcentaje de anticuerpos eluidos en cada ronda (CFU eluidas/ml); el grado de enriquecimiento final ( $\times 3,9$ ) se determinó considerando el control negativo (c-).

Las figuras 7A y 7B muestran el perfil de unión de los anticuerpos recombinantes AD38 y AD64, respectivamente, mediante inmunoensayo específico (ELISA) frente al péptido beta-amiloide 1-42.

La figura 8 muestra la secuencia nucleotídica de la cadena pesada del anticuerpo recombinante AD38 y su correspondiente secuencia aminoacídica, destacándose las regiones hipervariables o CDRs.

La figura 9 muestra la secuencia nucleotídica de la cadena ligera del anticuerpo recombinante AD38 y su correspondiente secuencia aminoacídica, destacándose las regiones hipervariables o CDRs.

La figura 10 muestra la secuencia nucleotídica de la cadena pesada del anticuerpo recombinante AD64 y su correspondiente secuencia aminoacídica, destacándose las regiones hipervariables o CDRs.

La figura 11 muestra la secuencia nucleotídica de la cadena ligera del anticuerpo recombinante AD64 y su correspondiente secuencia aminoacídica, destacándose las regiones hipervariables o CDRs.

### Descripción detallada de la invención

Los siguientes Ejemplos y las Figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no tienen el propósito de limitar la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### *Obtención de repertorios genéticos de inmunoglobulinas de sangre periférica de donantes sanos longevos*

##### *1. Elección de donantes adecuados para la construcción de librerías combinatoriales de anticuerpos humanos*

Se seleccionó un grupo de 4 individuos sanos longevos de edades comprendidas entre 90-102 años, para la obtención de librerías de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos recombinantes humanos. Dichos donantes sanos no inmunizados (Vj2, Vj3, Vj4 y Vj5) fueron escogidos como candidatos óptimos para la obtención de anticuerpos frente al péptido beta amiloide 1-42 por poseer plenas facultades cognitivas y buena salud sin presentar síntomas de Alzheimer u otra neuropatía sin haber recibido medicación alguna para la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

##### *2. Determinación de anticuerpos específicos en el suero de los donantes escogidos*

La detección de anticuerpos naturales anti-beta amiloide en el suero de los donantes, se examinó mediante un ensayo de inmunodetección específico que permite detectar reactividad frente al péptido beta-amiloide 1-42.

## ES 2 318 918 B1

Se desarrolló un ensayo de inmunodetección enzimática (ELISA) específica para identificar anticuerpos naturales anti péptido beta-amiloide 1-42 en suero humano, que incluyó la optimización de las diluciones de trabajo de los anticuerpos comerciales así como la puesta a punto de la detección de anticuerpos contra el péptido beta amiloide 1-42. Se evaluó un anticuerpo comercial de ratón anti beta-amiloide 1-42 (Pharmingen), mediante un inmunoensayo en placa, utilizando como tapiz el péptido beta-amiloide 1-42 humano (Pharmingen) a 5  $\mu\text{g/ml}$ . Posteriormente, se determinó la concentración de trabajo del anticuerpo secundario a utilizar. Para ello se realizaron varios ensayos utilizando los anticuerpos secundarios: anti-hFab-HRP (Pierce), anti IgG+IgM+IgA-HRP (Pierce); anti IgG (H+L)-HRP (Pierce), anti IgM (Pharmingen), anti MlgI-biotina (Pharmingen). Se concluyó que tan sólo dos de los anticuerpos secundarios probados reunían las características idóneas para nuestro propósito: el anticuerpo anti IgG+IgM+IgA-HRP (Pierce) y anti IgG (H+L) HRP (Pierce).

Una vez optimizadas las concentraciones de trabajo del anticuerpo comercial anti-beta 1-42 y del anticuerpo secundario, se procedió a detectar la existencia de anticuerpos anti péptido beta-amiloide 1-42 en el suero de los donantes. Para ello se realizó un ELISA utilizando como tapiz el péptido beta-amiloide 1-42 (Pharmingen) a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  y se incubaron varias diluciones de los sueros. El anticuerpo secundario utilizado fue anti IgG+IgM+IgA-HRP (Pierce). Los resultados se muestran en las Figuras 1A-1D. A la vista de estos resultados se comprobó la reactividad frente al péptido beta-amiloide 1-42 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) de los sueros Vj2 y Vj5 mediante diluciones. Como anticuerpo secundario fue utilizado el anticuerpo anti IgG (H+L)-HRP (Pierce). En las Figuras 2A y 2B se puede observar como estos dos sueros titulan frente al péptido beta-amiloide 1-42, siendo el suero del donante Vj2 el que presentó un mayor título de anticuerpos anti beta-amiloide. En base a los resultados obtenidos en los ensayos de detección de anticuerpos así como en el historial clínico, se escogió el donante Vj2 como candidato óptimo para el aislamiento del repertorio genético de inmunoglobulinas y la construcción de librerías para la selección de anticuerpos frente a la enfermedad de Alzheimer.

### 3. Obtención del repertorio de inmunoglobulinas

#### 3.1. Purificación de linfocitos B de sangre periférica y obtención del RNA molde

Los linfocitos de sangre periférica (entre 0.1 y 2.10<sup>8</sup> células) del donante seleccionado (Vj2) fueron obtenidos mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. El material genético (ARNm) fue extraído utilizando el producto comercial Tri-Reagent siguiendo el protocolo que aconseja el fabricante. La integridad y pureza del material extraído se analizó mediante geles de agarosa/formaldehído de alta resolución y analíticamente utilizando el método Bio-Sizing, para su cuantificación. Tras comprobar la integridad de cada muestra, el material resultante se considero satisfactorio en términos de calidad e integridad y se almacenó a -80°C para su posterior procesamiento en alícuotas apropiadas para ser utilizado como molde para la amplificación de todas las familias genéticas de los genes de inmunoglobulinas. Las muestras obtenidas fueron utilizadas para la construcción de las siguientes librerías:

- Librería de fragmentos de anticuerpos (Fab)
- Librería de anticuerpos de cadena sencilla (scFv).

#### 3.2. Obtención del repertorio de los genes de inmunoglobulinas mediante PCR

A partir de ARNm se sintetizó ADN complementario de cadena simple (ADNc) mediante la reacción de la transcriptasa reversa, empleándose como cebadores octámeros de deoxitimina (oligo-dt) (Pharmacia). El material fue alícuotado y se utilizó como molde para amplificar por PCR los fragmentos correspondientes a las cadenas pesadas (HC) de las inmunoglobulinas IgG1, así como las cadenas ligeras (LC) kappa. La amplificación por PCR se realizó utilizando protocolos convencionales y de manera independiente. Los diferentes fragmentos de las IgG1 fueron obtenidos independientemente, utilizando como cebadores diversos oligonucleótidos de cadena simple, representativos de todas las familias de genes variables (VH), en conjunción con el cebador específico C $\gamma$ 1 del primer dominio constante (CH1) de la cadena gamma-1. Las cadenas ligeras (LC) kappa fueron amplificadas de manera similar, empleando cebadores representativos de cada familia VK, junto con cebadores específicos de la región constante kappa (CK). Todos los cebadores, además de contener secuencias específicas para la amplificación de los genes variables o constantes, incluyen dianas específicas de restricción no presentes en los genes a fin de facilitar su clonado. Para cada pareja de cebadores la temperatura de apareamiento (Ta) empleada fue optimizada, en experimentos previos, a fin de lograr una amplificación de aproximadamente el 95% de los genes de cada familia VH y VK.

Para cada familia amplificada, los productos de PCR (HC o LC) fueron aislados de geles de Agarosa 2%, purificados, cuantificados y combinados de manera proporcional, para obtener el repertorio final (Figuras 3A y 3B). Este material fue empleado como molde en una segunda amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos externos, con el fin de extender los productos, facilitar la posterior digestión con enzimas de restricción e incrementar su eficiencia de clonado. Los resultados se ilustran en la Figura 3C. Una vez amplificados, los productos de cada repertorio (HC-G1 y LC-kappa) fueron purificados independientemente. Los repertorios VH fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y SpeI y fueron purificados de geles de agarosa por Quiackick. El repertorio LC-kappa fue digerido con SacI y XbaI y purificado de la misma manera.

## ES 2 318 918 B1

Adicionalmente, el mismo material de partida fue utilizado para obtener un repertorio de fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (scFv), mediante el empleo de cebadores específicos. El abordaje utilizado permite obtener del mismo donante dos librerías de anticuerpos: una en formato Fab (fragmentos de anticuerpo) y otra en formato scFv. Dichos fragmentos de cadena sencilla se componen de segmentos VH fusionados mediante un linker flexible ( $G_4S_2$ ) a la región variable de las cadenas ligeras. Todas las amplificaciones fueron optimizadas previamente hasta lograr un rendimiento del 90-100%. Los resultados se ilustran en las Figuras 4A y 4B. Una vez realizadas las amplificaciones, se procedió a extraer y purificar de geles preparativos las bandas positivas representativas de cada familia, posteriormente el material fue fusionado mediante PCR overlap para su amplificación conjunta utilizándose para ello los cebadores RSC-F y RSC-B (Figura 4C). Finalmente las bandas obtenidas fueron digeridas y purificadas.

### Ejemplo 2

#### *Construcción de librerías combinatoriales de anticuerpos de alta complejidad*

##### *1. Librería de fragmentos Fab*

La librería de fragmentos Fab se construyó mediante clonado y ensamblaje, empleando los repertorios gamma-1 combinados con la totalidad de las cadenas ligeras kappa en formato de Fab, utilizando el vector fagémido pComb3 XX. Este vector permite el clonado de las CL en los sitios de restricción SacI-Xba I y de las HC en los sitios de restricción XhoI-SpeI. Las librerías se construyeron de manera secuencial. Primero se realizó el clonado del repertorio correspondiente a las cadenas ligeras y posteriormente el de las cadenas pesadas.

La preparación del vector pComb3 XX SacI/XbaI fue optimizada en experimentos pilotos, hasta obtener un alto nivel de ligación de las CL ( $>1 \times 10^8$  colonias transformantes/ $\mu$ g de ADN) y una baja eficiencia de religación ( $<1\%$ ) en ausencia de insertos, antes de proceder al clonado del repertorio LC-kappa. Posteriormente, todo el producto de ligación fue utilizado para transformar mediante electroporación bacterias *E. coli* altamente competentes (Eficiencia  $> 5 \cdot 10^9$  transformantes/ $\mu$ g de ADN). Tras el crecimiento bacteriano todo el cultivo bacteriano fue centrifugado a baja velocidad y tratado convenientemente para extraer el ADN fagémido. El ADN fue purificado, cuantificado y sometido a digestión con las enzimas de restricción XhoI y SpeI. El vector resultante fue cuantificado y utilizado para el clonado de los repertorios HC-IgG1. Tras precipitación, los productos de la ligación fueron transformados de manera independiente, mediante electroporación en *E. coli* y el ensamblaje final se realizó mediante la infección con fago M13 helper para constituir una librería de expresión de anticuerpos del repertorio kappa-IgG1 de  $1 \times 10^7$  anticuerpos.

##### *2. Librería de fragmentos de cadena sencilla (scFv)*

La librería de fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) del mismo donante (Vj2) fue construida mediante el clonaje de secuencias de fragmentos simples de las regiones variables de las inmunoglobulinas correspondientes a los repertorios Gamma y Kappa solapadas mediante un linker flexible  $G_4S_2$ . Tras la digestión enzimática, los repertorios fueron clonados en el vector pComb3XX. El tamaño obtenido fue de  $5 \times 10^6$  clones independientes.

##### *3. Comprobación de la diversidad de las librerías de anticuerpos mediante secuenciación del segmento H-CDR3*

De cada librería se extrajo el material genético de 15-20 clones productores de anticuerpos. La secuenciación al azar del segmento HCDR3, indicó que las librerías se componen de una amplia diversidad, tanto en el tamaño de los CDR3 HC (6-21 aminoácidos de largo), como en su secuencia. Como ejemplo, la Figura 5 muestra las secuencias HCDR3 de varios clones escogidos al azar de la librería de fragmentos de anticuerpo (Fab) y de la librería de fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv).

Se han obtenido librerías de anticuerpos humanos que incluyen dos formatos (Fab y scFv). Dichas librerías representan una amplia colección de anticuerpos humanos y constituyen una herramienta altamente útil en la búsqueda de anticuerpos específicos dirigidos frente al péptido beta-amiloide 1-42.

### Ejemplo 3

#### *Selección antigénica de la librería de fragmentos de cadena sencilla*

La selección antigénica contra el péptido beta amiloide 1-42 de la librería de fragmentos de cadena sencilla (scFv) se llevó a cabo mediante un inmunoensayo frente al péptido amiloide beta 1-42 inmovilizado en fase sólida (ELISA), utilizando BSA como control negativo (c-). En cada ciclo, la librería de fragmentos scFv fue amplificada hasta  $10^{13}$  clones/ml y seleccionada en las condiciones previamente determinadas incrementándose la astringencia de los lavados en cada ronda de selección. Previamente se optimizaron las concentraciones de péptido a utilizar en la selección contra el péptido amiloide 1-42 en fase sólida. En el proceso de selección antigénica se obtuvo un grado de selección significativo tal y como se ilustra en la Figura 6.

## Ejemplo 4

*Identificación de anticuerpos humanos diana específicos de alta afinidad*

5 Tras la selección antigénica de la librería de fragmentos de cadena sencilla, la identificación de clones de anticuerpos específicos frente al péptido beta amiloide se llevó a cabo mediante la transfección del material genético de los anticuerpos obtenidos en bacterias apropiadas para la expresión de moléculas scFv solubles.

10 En el procedimiento de selección antigénica, del total de clones obtenidos en el último ciclo de selección, se escogieron clones al azar y se ordenaron en placas de cultivo master. La producción de anticuerpos en los clones bacterianos fue optimizada mediante ensayos piloto para obtener una máxima expresión. Tras la determinación de las condiciones óptimas se analizaron 235 clones escogidos al azar del master. Cada clon bacteriano fue crecido en condiciones óptimas de cultivo para la producción de anticuerpos y finalmente estos fueron extraídos del sobrenadante para su caracterización.

15

## Ejemplo 5

*Caracterización de los anticuerpos humanos obtenidos frente al péptido beta amiloide 1-42*

20

Tras la identificación de anticuerpos humanos específicos, se procedió a la caracterización genética, estructural y funcional de dichos anticuerpos.

25 Los anticuerpos obtenidos de la selección de la librería de anticuerpos de fragmentos de cadena sencilla fueron analizados mediante inmunoensayo específico frente al péptido beta-amiloide 1-42 y BSA. Se obtuvieron un total de 5 anticuerpos recombinantes que presentaron reactividad específica contra el péptido beta amiloide 1-42 y el resto presentó reactividad contra beta amiloide 1-42 y BSA. Dos de dichos anticuerpos recombinantes, AD38 y AD64, presentaron mejores perfiles de unión al péptido beta amiloide 1-42. Estos fueron purificados a mediana escala (0,5-1 mg/l) y evaluados a diferentes concentraciones en inmunoensayo frente al péptido 1-42. Los resultados obtenidos se resumen en las Figuras 7A y 7B, en las cuales se observa que ambos anticuerpos reconocen específicamente la diana uniéndose de manera dosis dependiente.

30

35 La caracterización genética se llevó a cabo mediante la determinación de las secuencias de nucleótidos de forma automática. La lectura y edición fue realizada utilizando el programa SegEd (Applied Biosystems) y el análisis posterior fue realizado utilizando GCG (University of Wisconsin Genetic Computer Group-Madison, WI) y Analyze (MacMolly<sup>®</sup>Tetra Sof Gen GmbH (version 3.10)). La identidad de los genes VH, DH, JH y VK, JK fue determinada utilizando FASTA (GenBank), Blast e IgBlast (NCBI) en conjunción con MacMolly (Aling y Complign) y DNAPLOT (Versión 2.0.1) aplicados localmente a la base de datos de anticuerpos humanos VBASE (Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, UK) (Tomlinson, 1992). El índice de mutaciones de reemplazo y silentes (R:S) observadas en las HC y LC, después de la comparación con los correspondientes genes genómicos (*germ line*), fue calculado manualmente. Los índices R:S teóricos o inherentes para cada gen germinal, fueron calculados individualmente para cada codón y región utilizando el programa InhSusCalc v1.0.

40

45 Una vez conocidas las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de anticuerpos scFv AD38 (SEQ ID NO 9) y AD64 (SEQ ID NO 11), se identificaron dichos anticuerpos recombinantes como únicos. Sus cadenas pesadas derivaron de la familia génica VHIII y las cadenas ligeras de las familias génicas VKIII y VKII. En la Tabla 1 se muestra la derivación genética y las secuencias de los segmentos CDR3 (Complementary-Determining Region-3) de los anticuerpos recombinantes AD38 y AD64; y en la Tabla 2 se muestran los índices R:S. En ambos anticuerpos se observaron numerosas mutaciones somáticas en comparación con sus genes genómicos correspondientes (*germ line*), indicando la existencia de procesos de maduración antigénica frente al péptido beta-amiloide 1-42.

50

55 Tanto el análisis funcional realizado como las características genéticas halladas tras la secuenciación indican que los anticuerpos AD38 y AD64 son específicos, presentan características de maduración antigénica y reflejan parte de una respuesta inmune competente frente al péptido beta amiloide. Este hecho, los hace excelentes candidatos para una posterior evaluación funcional con el fin de determinar su utilidad como agentes diagnósticos, terapéuticos o de imagen.

60

65

# ES 2 318 918 B1

TABLA 1

Anticuerpo	VH <i>germline</i>	DH <i>germline</i>	JH <i>germline</i>	HCDR3
<b>AD38</b>	COS-6/DA-8	D6-6/DN4	JH4a	ELRGWSIEY
<b>AD64</b>	DP-38/9-1	D2	JH3a	DDYDF
Anticuerpo	Vk <i>germline</i>		JL <i>germline</i>	LCDR3
<b>AD38</b>	Vg/38K		JK5	QHRRDWPPGA T
<b>AD64</b>	DPK15/A19		JK4	MQALHNPLT

TABLA 2

Cadena pesada (HC)							
Anticuerpo	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	FRs R:S	CDRs R:S
<b>AD38</b>	5:2	1:0	2:1	8:4	8:3	15:6	9:4
<b>AD64</b>	6:3	1:1	0:0	10:2	7:6	13:9	11:3
Cadena ligera (LC)							
Anticuerpo	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	FRs R:S	CDRs R:S
<b>AD38</b>	5:2	4:0	3:2	3:0	4:1	12:5	7:0
<b>AD64</b>	4:0	3:0	1:1	2:1	2:1	7:2	5:1

## Bibliografía

■ Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5; 215(3):403-10.

■ Balint RF, Larrick JW. Antibody engineering by parsimonious mutagenesis. *Gene.* 1993 Dec 27; 137(1):109-18.

■ Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.* 2000 Aug; 6(8):916-9.

■ Baril L, Nicolas L, Croisile B, Crozier P, Hessler C, Sassolas A, McCormick JB, Trannoy E. Immune response to Abeta-peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Neurosci Lett.* 2004 Jan 30; 355(3):226-30.

■ Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol.* 1997 Jun; 15(6):553-7.

■ Chamow S.M. and Ashkenazi A. Antibody fusion proteins. *Wiley-Liss*, New York, USA. 1999.

## ES 2 318 918 B1

- **DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM.** Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Jul 17; 98(15):8850-5.
- 5
  - **Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, Jackel S, Wei X, Buerger K, Hoff C, Hemmer B, Moller HJ, Farlow M, Oertel WH, Sommer N, Du Y.** Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2002 Aug; 52(2):253-6.
- 10
  - **Du Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B, Bales K, Gao F, Moeller HJ, Oertel W, Farlow M, Paul S.** Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology.* 2001 Sep 11; 57(5):801-5.
  - **Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L.** An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell.* 1980 Apr; 19(4):981-92.
- 15
  - **Foote J, Milstein C.** Kinetic maturation of an immune response. *Nature.* 1991 Aug 8; 352(6335):530-2.
  - **Frenkel D, Solomon B, Benhar I.** Modulation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody. *J Neuroimmunol.* 2000 Jul 1; 106(1-2):23-31.
- 20
  - **Fuchs P, Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Little M.** Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. *Biotechnology (N Y).* 1991 Dec; 9(12):1369-72.
  - **George A. and Urch C.** Diagnostic and therapeutic antibodies. *Humana Press, New Jersey, USA.* 2000.
- 25
  - **Hanes J, Pluckthun A.** *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 May 13; 94(10):4937-42.
  - **Hock C, Konietzko U, Papassotiropoulos A, Wollmer A, Streffer J, von Rotz RC, Davey G, Moritz E, Nitsch RM.** Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat Med.* 2002 Nov; 8(11):1270-5.
- 30
  - **Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Muller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, Wollmer MA, Umbricht D, de Quervain DJ, Hofmann M, Maddalena A, Papassotiropoulos A, Nitsch RM.** Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2003 May 22; 38(4):547-54.
- 35
  - **Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Woolven BP, Tomlinson IM.** Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol.* 2003 Nov; 21(11):484-90.
- 40
  - **Hyman BT, Smith C, Buldyrev I, Whelan C, Brown H, Tang MX, Mayeux R.** Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2001 Jun; 49(6):808-10.
  - **Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D.** A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature.* 2000 Dec 21-28; 408(6815):979-82.
- 45
  - **Kabat E.A., Wu T.T., Bilofsky, H.** Variable region genes for immunoglobulin framework are assembled from small segments of DNA—a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75, 2429-2433.
- 50
  - **Kawas C, Gray S, Brookmeyer R, Fozard J, Zonderman A.** Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology.* 2000 Jun 13; 54(11):2072-7.
- 55
  - **Kennet R, McKearn T and Bechtol K.** Monoclonal antibodies. Hybridomas: a new dimension in biological analyses. *Plenum Press.* New York and London. 1980.
  - **Little M, Breitling F, Micheel B, Dubel S.** Surface display of antibodies. *Biotechnol Adv.* 1994; 12(3):539-55.
- 60
  - **Marks JD, Griffiths AD, Malmqvist M, Clackson TP, Bye JM, Winter G.** By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N Y).* 1992 Jul; 10(7):779-83.
  - **McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ.** Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 1990 Dec 6; 348(6301):552-4.
- 65
  - **Monsonogo A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, Budson AE, Sperling R, Selkoe DJ, Weiner HL.** Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2003 Aug; 112(3):415-22.

## ES 2 318 918 B1

- **Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW.** A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000 Dec 21-28; 408(6815):982-5.
- 5 ■ **Morgan D, Gitter BD.** *Neurobiol Aging*. Evidence supporting a role for anti-Abeta antibodies in the treatment of Alzheimer's disease. 2004 May-Jun; 25(5):605-8.
- **Munch G, Robinson SR.** Potential neurotoxic inflammatory responses to Abeta vaccination in humans. *J Neural Transm*. 2002 Jul; 109(7-8):1081-7.
- 10 ■ **Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C.** Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*. 2003 Jul 8; 61(1):46-54.
- 15 ■ **Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D,** Seubert Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999 Jul 8; 400(6740):173-7.
- 20 ■ **Schenk D.** Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Oct; 3(10):824-8.
- **Selmes van den Bril, J.** El nuevo concepto de enfermedad socio-sanitaria y sus implicaciones. Real Academia Nacional de Farmacia. 2003 Oct, ([www.raf.es/pdf/fundacion/Alzheimer.pdf](http://www.raf.es/pdf/fundacion/Alzheimer.pdf)).
- 25 ■ **Steward MW, Stanley CM, Obeid OE.** A mimotope from a solid-phase peptide library induces a measles virus-neutralizing and protective antibody response. *J Virol*. 1995 Dec; 69(12):7668-73.
- **Tonegawa S.** Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983 Apr 14; 302(5909):575-81.
- 30 ■ **Weissleder R.** Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:11-18
- **Weksler ME and Goodhardt M.** Do age-associated changes in "physiologic" autoantibodies contribute to infection, atherosclerosis, and Alzheimer's disease? *Exp Gerontol*. 2002 Aug-Sep; 37(8-9):971-9.
- 35 ■ **Weksler ME, Relkin N, Turkenich R, LaRusse S, Zhou L, Szabo P.** Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol*. 2002 Jul; 37(7):943-8.
- 40 ■ **Williams SC, Winter G.** Cloning and sequencing of human immunoglobulin V lambda gene segments. *Eur J Immunol*. 1993 Jul; 23(7):1456-61.
- **Zachau HG.** The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene*. 1993 Dec 15; 135(1-2):167-73.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

# ES 2 318 918 B1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42 que comprende una o más de las secuencias seleccionadas de entre el grupo constituido por:
- SEQ ID NO 2
  - SEQ ID NO 4
  - 10 ■ Secuencias homólogas a SEQ ID NO 2 o SEQ ID NO 4.
- 15 2. Anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, según la reivindicación anterior, que comprende al menos una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende la secuencia SEQ ID NO 2 y la cadena ligera comprende la secuencia SEQ ID NO 4.
- 20 3. Anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42 que comprende una o más de las secuencias seleccionadas de entre el grupo constituido por:
- SEQ ID NO 6
  - SEQ ID NO 8
  - 25 ■ Secuencias homólogas a SEQ ID NO 6 o SEQ ID NO 8.
- 30 4. Anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, según la reivindicación anterior, que comprende al menos una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende la secuencia SEQ ID NO 6 y la cadena ligera comprende la secuencia SEQ ID NO 8.
- 35 5. Anticuerpo, fragmento funcional del mismo o derivado con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42, obtenido mediante estrategias de maduración de la afinidad a partir de los anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Fragmento funcional de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho fragmento es un scFv.
7. Anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado que comprenda parte de cualquiera de las secuencias definidas en la reivindicación 2 o combinaciones de éstas con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42.
- 40 8. Anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado que comprenda parte de cualquiera de las secuencias definidas en la reivindicación 4 o combinaciones de éstas con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42.
9. Anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado que comprenda parte de cualquiera de las secuencias definidas en la reivindicación 6 o combinaciones de éstas con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42.
- 45 10. Molécula de ácido nucleico seleccionada entre:
- a. una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
  - 50 b. una molécula de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos difiera de las secuencias definidas en (a) debido a la degeneración del código genético; y
  - c. una molécula de ácido nucleico homóloga a las secuencias definidas en (a).
- 55 11. Molécula de ácido nucleico, según la reivindicación anterior, que comprende cualquiera de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 7, o combinaciones de éstas.
12. Vector que comprende una molécula de ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11.
- 60 13. Célula hospedadora que contiene un vector, según la reivindicación anterior.
14. Uso de un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la elaboración de una composición farmacéutica.
- 65 15. Composición farmacéutica, según la reivindicación anterior, para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

## ES 2 318 918 B1

16. Procedimiento de obtención de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos con capacidad de unión al péptido beta-amiloide 1-42 a partir del repertorio genético de inmunoglobulinas aislado de donantes sanos nonagenarios que comprende clonar y expresar dicho repertorio genético de inmunoglobulinas en los vectores y células adecuadas para la clonación y expresión de dicho repertorio y seleccionar aquellos que presentan afinidad por el péptido beta-amiloide 1-42.

17. Uso de un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la detección del péptido beta-amiloide 1-42 *in vitro*.

18. Uso de un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la detección del péptido beta-amiloide 1-42 *in vivo*.

19. Uso de un anticuerpo, fragmento del mismo o derivado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la identificación de un compuesto capaz de competir con dicho anticuerpo, fragmento o derivado por la unión al péptido beta amiloide 1-42.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

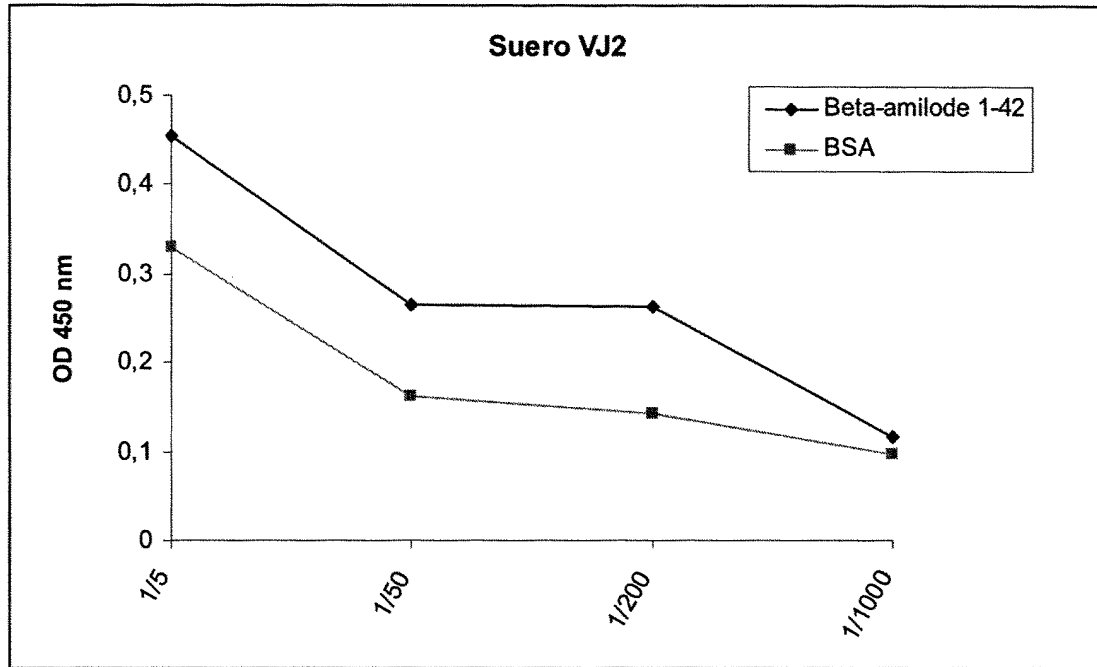


FIG. 1B

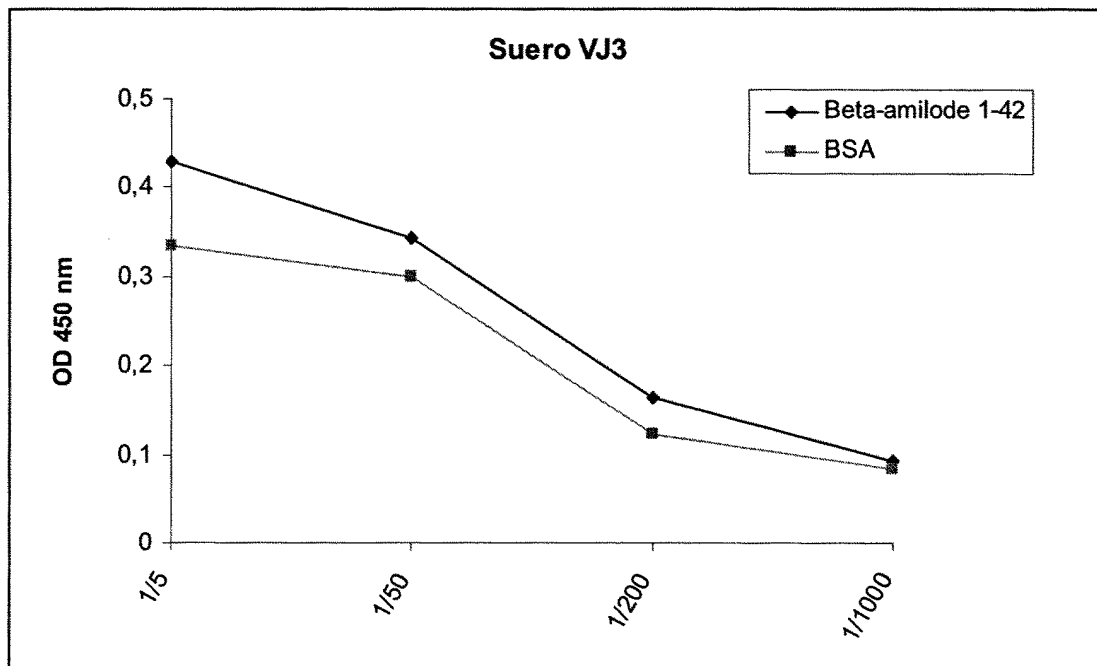


FIG. 1C

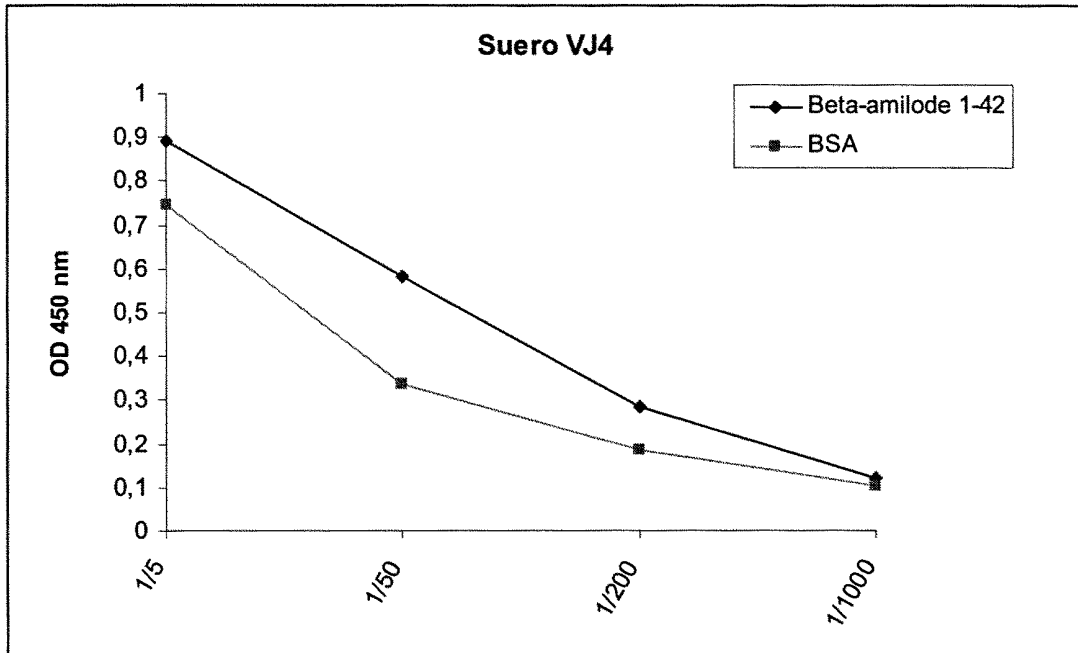


FIG. 1D

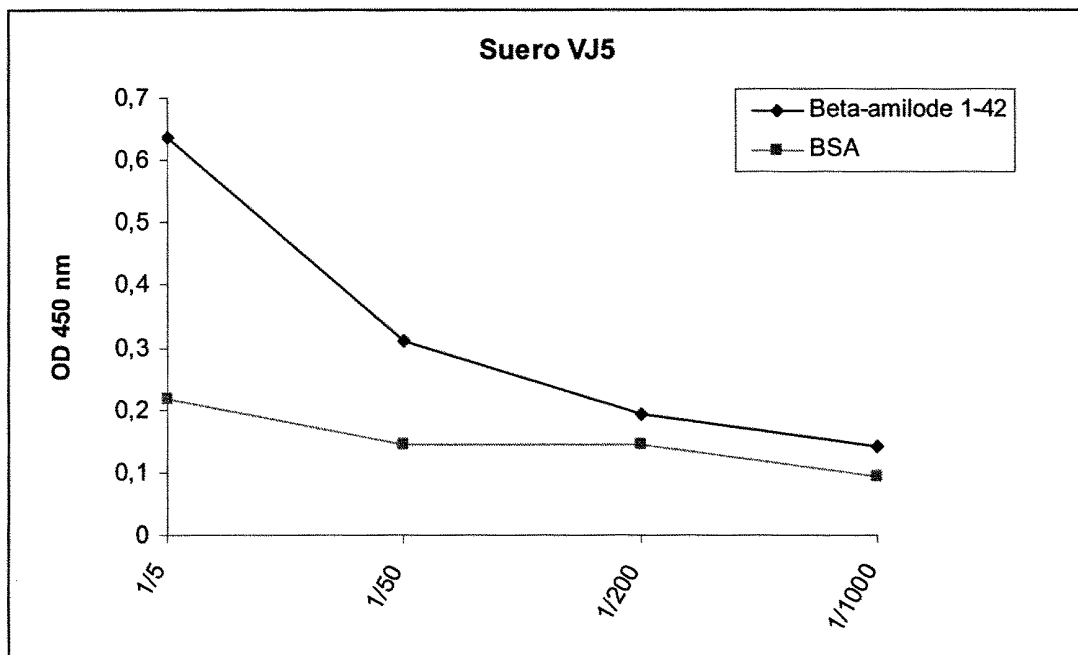


FIG. 2A

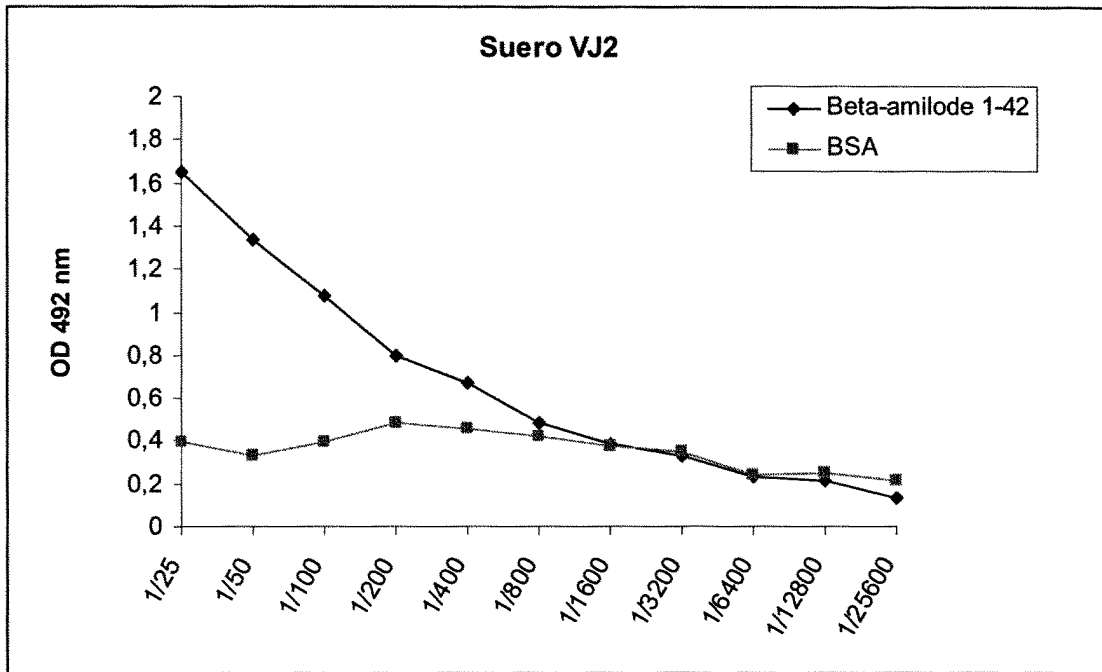


FIG. 2B

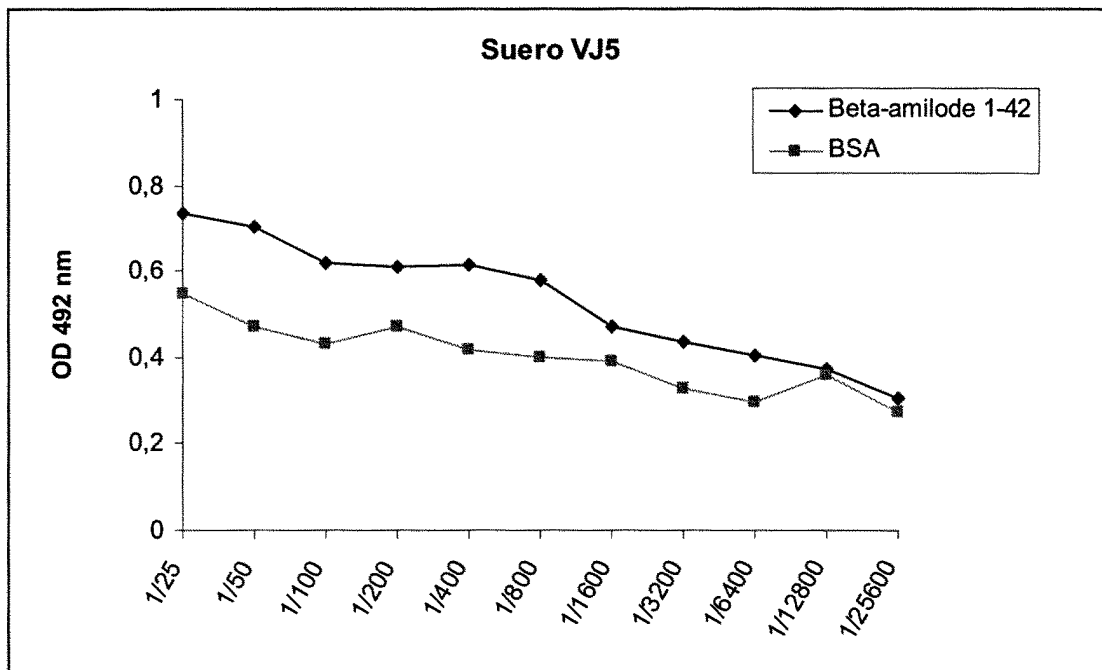


FIG. 3A

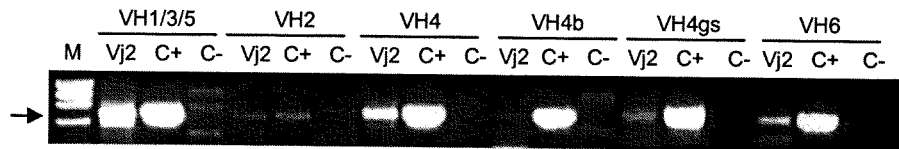


FIG. 3B

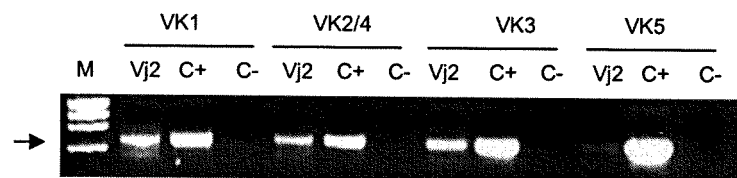


FIG. 3C

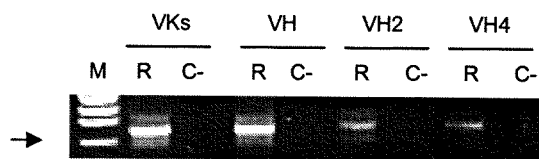


FIG. 4A

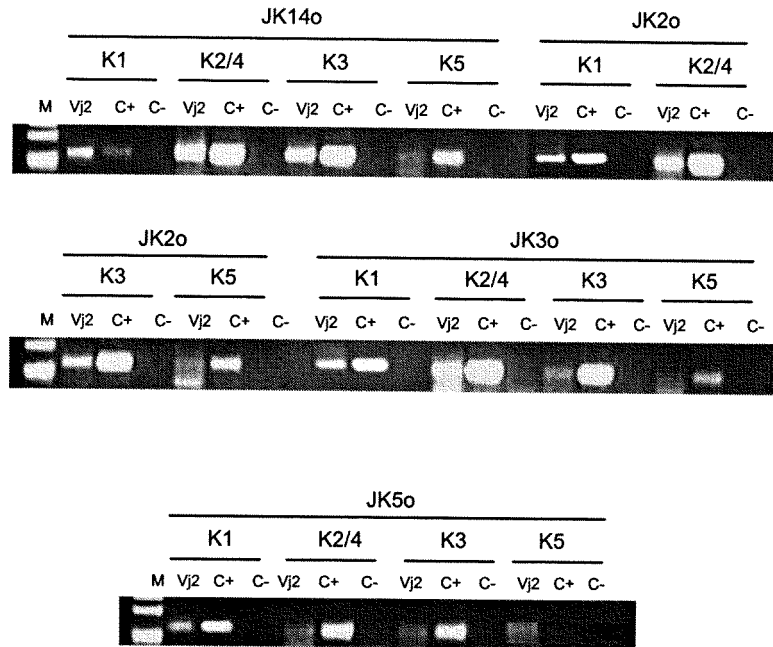


FIG. 4B

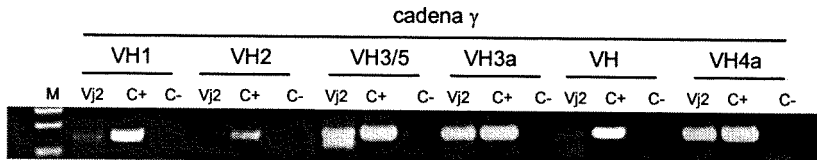


FIG. 4C

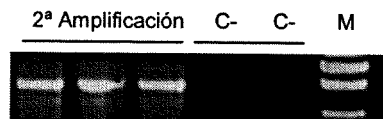


FIG. 5

YYF / CLQHDSFPRT(10) / FGQG	CAR / LSEYYSRAHGMDV(13) / WGQG
YYC / QQYGSSLT(8) / FGGG	CAR / DRGLGWLRFPL(10) / WGQG
YYC / QQSYSYPLT(9) / FGQG	CAR / DGYDFWSGYRMDV(13) / WGQG
YYC / QQRNNWPLT(9) / FGGG	CAR / GGTGEDWYFDL(11) / WGQG
YYC / QQYNSYSWT(9) / FGQG	CAR / DGAPLDYKNSGYMDV(16) / WGEQ
YYC / QQYGTSWT(8) / FGQG	CAT / DPLTVPTGPLTTGTMET(17) / WGEQ
YYC / QQIYSSPPEST(11) / FGQG	CAR / LRYLKEGFDY(10) / WGQG
YYC / QQRSNWPPSLT(11) / FGGG	CAT / GDVFDV(6) / WGQG
YYC / QQYGSSEWT(9) / FGQG	CNR / DPPPSIGVESPAIGDDY(17) / WGQG
YYC / QQRNSWPWT(9) / FGQG	CAR / ESPTAGDYSEDY(12) / WCQD
	CAR / HQQLYYYYIDV(11) / WGKG
	CAL / TSGWYPRSASEI(12) / WDGQ
	CAR / VSRDYKSSLKY(12) / WGQG
	CAR / DPYGANGPSNDT(12) / WGAG

FIG. 6

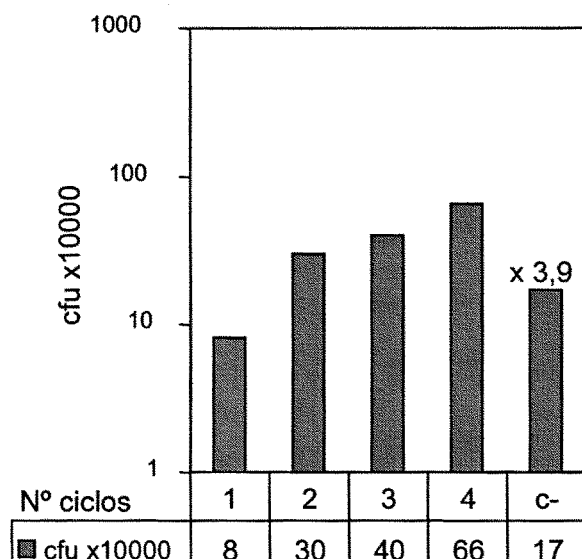


FIG. 7A

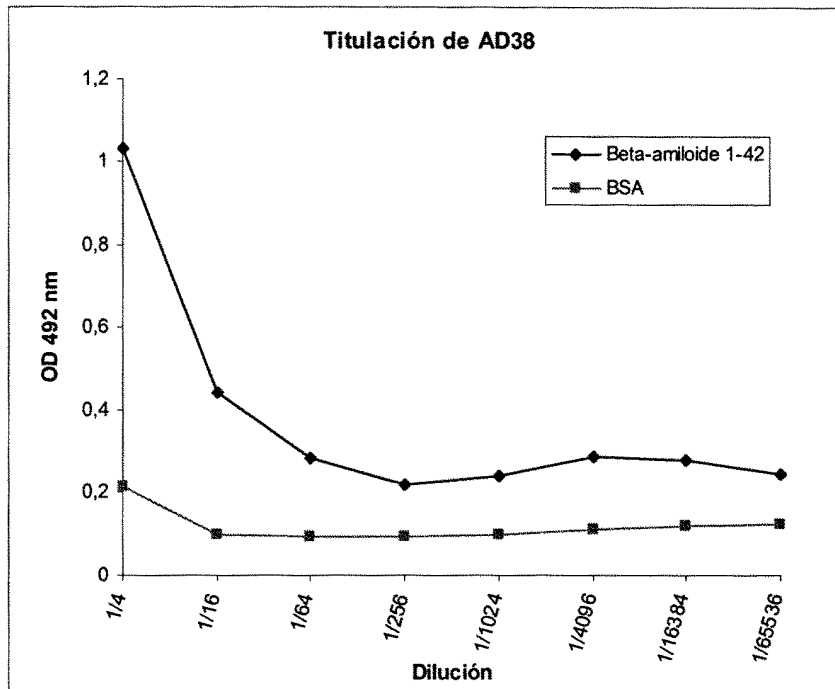
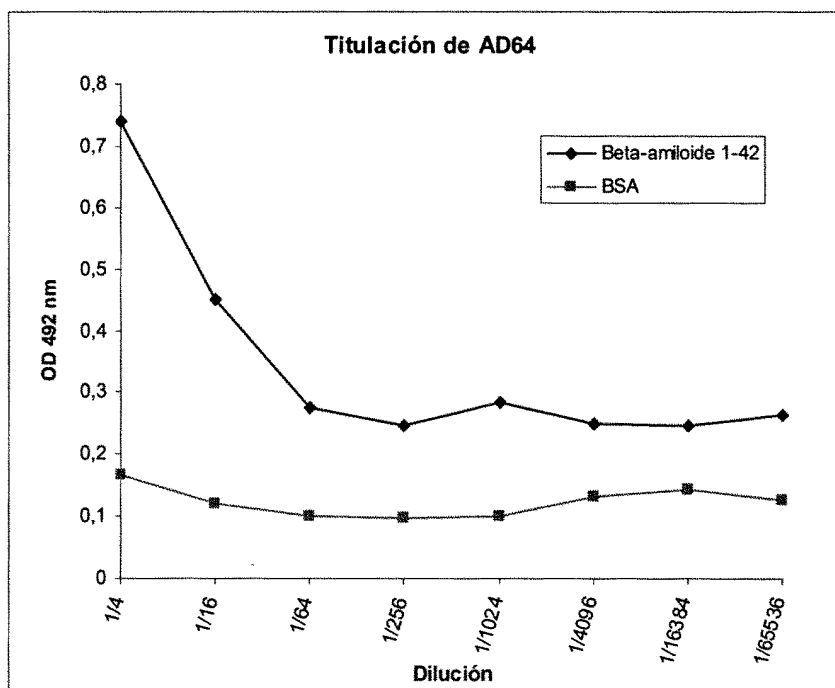


FIG. 7B



**FIG. 8**

**CADENA PESADA AD38 (HC38)**

HC/38 GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC CTA GTT CAG CCG GGG GGC TCC CTG AGA CTC TCC  
 E V Q L L E S G G L V Q P G G S L R L S

HC/38 TGT ACA GCC TCT GGA TTC GTC TTC AGT GAC TAC TGG ATG CAC TGG GTC CGC CAA GGT CCA GGG  
 C T A S G F V F S D Y W M H W V R Q A P G

HC/38 AAG GGG CTG GTT TGG ATT TCA CGT CTT AAG AGT GAT GGA AGT AGT AGA AGT TAT GCG GAC TTT  
 K G L V W I S R L K S D G S S R S Y A D F

HC/38 GTG AAG GGC CGA TTC ACC GTC TCC AGA GAC AAC GTC AAG AAT ACA CTG TTT TTG CAA ATC AAC  
 V K G R F T V S R D N V K N T L F L Q I N

HC/38 AGT CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTC TAT TGT GCA AGA GAG TTA CGT GGC TGG TCC ATT  
 S L R A E D T A V Y Y C A R E L R G W S I

GAA TAT TGG GGC CAC GGA ACT CAG GTC ACC GTC TCC TCA GCT TCC ACC AAG  
 E Y W G H G T Q V T V S S A S T K

CDR1

CDR2

CDR3

FIG. 9

CADENA LIGERA AD38 (LC38)

LC/38 GAG CTC GTG TTG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGA GAA AGA GCC ACC CTC  
 E L V L L T Q S P A T L S L S P G E R A T L

LC/38 TTC TGC AGG GCC AGT CAG GAT ATT AGC ACC TCC TTA GCC TGG TAT CAA CAA AAA CCT GGC CAG  
 F C R A S Q D I S T S L A W Y Q Q K P G Q  
 CDR1

LC/38 GTT CCC AGG CTC ATC TAT GGC ACA TCC TAT AGG GCC ACT GGC ATC TCA GCC AGG TTC AGT  
 V P R L L I Y G T S Y R A T G I S A R F S  
 CDR2

LC/38 GGC CGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAC TTT GCA  
 G R G S G T D F T L T I S S L E P E D F A

LC/38 TTG TAT TAC TGT CAA CAC CGG AGG GAC TGG CCT CCG GGG GCC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA  
 L Y Y C Q H R R D W P P G A T F G Q G T R  
 CDR3

CTG GAG ATT AAA  
 L E I K

FIG. 10

CADENA PESADA AD64 (HC64)

HC/64	GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA AAG CCG GGG GGG TCC CTC AGA CTC TCC E V Q L V Q S G G L V K P G G S L R L S
HC/64	TGT GTC GGC TCT GGA TTC ACT TTC ACT AAT GCC TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG C V G S G F T F T N A W M S W V R Q A P G
	CDR1
HC/64	AAG GGG CTG GAG TGG GTT GGC CGT ATG AAA AGC AAG ACT TAT GGC TGG ACA ACA GAA TTT GCT K G L E W V G R M K S K T Y G W T T E F A
	CDR2
HC/64	ACA GCC GTG GAA GGC AGA TTC ACC ATG TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACA CTC TAT TTG CAA T A V E G R F T M S R D S K N T L Y L Q
	CDR3
HC/64	ATG AAC AGC CTG AAA ACC GAG GAC ACA GCC GTG TAT TAT TGC TCC ACA GAT GAC TAT GAT TTT M N S L K T E D T A V Y Y C S T D D Y D F
	CDR3
HC/64	TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA GCT TCC ACC AAG W G Q G T M V T V S S A S T K

FIG. 11

**CADENA LIGERA AD64 (LC AD64)**

LC/64 GAG CTC GTG ATG ACT CAG TCT CCA GTC TCC CTG GCC GTC ACC CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC  
 E L V M T Q S P V S L A V T P G E P A S I

LC/64 TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG TTT AGT AAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG TAC CTT  
 S C R S S Q S L L F S N G F H Y L D W Y L  
 CDR1

LC/64 CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCC AGT CGG GCC TCC GGG GTC  
 Q K P G Q S P Q L L I Y L G S S R A S G V  
 CDR2

LC/64 CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC TCA GAT TTC ACA CTG AAA ATC AGC AGA GTG GAG  
 P D R F S G S G S G S D F T L K I S R V E

LC/64 GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAT AAT CCG CTC ACT TTC GGC GGA  
 A E D V G V Y Y C M Q A L H N P L T F G G  
 CDR3

GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA  
 G T K L E I K

# ES 2 318 918 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENETRIX S.L

5 <120> Anticuerpos humanos con capacidad de unión al péptido beta-amiloide y sus aplicaciones

<130> Alz

10 <160> 12

<170> PatentIn version 3.2

15 <210> 1

<211> 366

<212> DNA

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(366)

<223> Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo recombinante AD38

<400> 1

```
30   gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc cta gtt cag ccg ggg ggg
    48
    Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
    1           5           10           15
35   tcc ctg aga ctc tcc tgt aca gcc tct gga ttc gtc ttc agt gac tac
    96
    Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Asp Tyr
           20           25           30
40   tgg atg cac tgg gtc cgc caa gct cca ggg aag ggg ctg gtt tgg att
    144
    Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Ile
           35           40           45
45   tca cgt ctt aag agt gat gga agt agt aga agt tat gcg gac ttt gtg
    192
    Ser Arg Leu Lys Ser Asp Gly Ser Ser Arg Ser Tyr Ala Asp Phe Val
           50           55           60
50   aag ggc cga ttc acc gtc tcc aga gac aac gtc aag aat aca ctg ttt
    240
    Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Phe
    65           70           75           80
55   ttg caa atc aac agt ctg aga gcc gag gac acg gct gtc tat tac tgt
    288
    Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
60   gca aga gag tta cgt ggc tgg tcc att gaa tat tgg ggc cac gga act
    336
    Ala Arg Glu Leu Arg Gly Trp Ser Ile Glu Tyr Trp Gly His Gly Thr
    65           100           105           110
```

ES 2 318 918 B1

cag gtc acc gtc tcc tca gct tcc acc aag  
366  
Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
115 120

5

<210> 2

<211> 122

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

15

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

20

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

25

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

30

Ser Arg Leu Lys Ser Asp Gly Ser Ser Arg Ser Tyr Ala Asp Phe Val  
50 55 60

35

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

40

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

45

Ala Arg Glu Leu Arg Gly Trp Ser Ile Glu Tyr Trp Gly His Gly Thr  
100 105 110

50

Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
115 120

<210> 3

<211> 327

55 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

60 <221> CDS

<222> (1)..(327)

<223> Dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo recombinante AD38

65

ES 2 318 918 B1

<400> 3

gag ctc gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca gga  
 48  
 5 Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 gaa aga gcc acc ctc ttc tgc agg gcc agt cag gat att agc acc tcc  
 96  
 10 Glu Arg Ala Thr Leu Phe Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 tta gcc tgg tat caa caa aaa cct ggc cag gtt ccc agg ctc ctc atc  
 144  
 15 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 tat ggc aca tcc tat agg gcc act ggc atc tca gcc agg ttc agt ggc  
 192  
 20 Tyr Gly Thr Ser Tyr Arg Ala Thr Gly Ile Ser Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 cgt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct  
 240  
 25 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 gaa gac ttt gca ttg tat tac tgt caa cac cgg agg gac tgg cct ccg  
 288  
 30 Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln His Arg Arg Asp Trp Pro Pro  
 85 90 95  
 35 ggg gcc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa  
 327  
 40 Gly Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 4

<211> 109

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 318 918 B1

<400> 4

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

<210> 5

<211> 360

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<223> Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo recombinante AD64

45

50

55

60

65

ES 2 318 918 B1

<400> 5

5 gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta aag ccg ggg ggg  
 48  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 10 tcc ctc aga ctc tcc tgt gtc ggc tct gga ttc act ttc act aat gcc  
 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala  
 20 25 30  
 15 tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt  
 144  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 20 ggc cgt atg aaa agc aag act tat ggc tgg aca aca gaa ttt gct aca  
 192  
 Gly Arg Met Lys Ser Lys Thr Tyr Gly Trp Thr Thr Glu Phe Ala Thr  
 50 55 60  
 25 gcc gtg gaa ggc aga ttc acc atg tca aga gat gat tca aaa aac aca  
 240  
 Ala Val Glu Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 30 ctc tat ttg caa atg aac agc ctg aaa acc gag gac aca gcc gtg tat  
 288  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 35 tat tgc tcc aca gat gac tat gat ttt tgg ggc caa ggg aca atg gtc  
 336  
 Tyr Cys Ser Thr Asp Asp Tyr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val  
 100 105 110  
 40 acc gtc tct tca gct tcc acc aag  
 360  
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 115 120  
 45

<210> 6

50 <211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 318 918 B1

<400> 6

5      Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
       1                   5                   10                   15  
 10     Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala  
           20                   25                   30  
 15     Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
           35                   40                   45  
 20     Gly Arg Met Lys Ser Lys Thr Tyr Gly Trp Thr Thr Glu Phe Ala Thr  
           50                   55                   60  
 25     Ala Val Glu Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
           65                   70                   75  
 30     Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
           85                   90                   95  
 35     Tyr Cys Ser Thr Asp Asp Tyr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val  
           100                   105                   110  
 40     Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
           115                   120

<210> 7

<211> 336

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<223> Dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo recombinante AD64

50 <400> 7

55      gag ctc gtg atg act cag tct cca gtc tcc ctg gcc gtc acc cct gga  
       48  
       Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Ala Val Thr Pro Gly  
       1                   5                   10                   15  
 60      gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg ttt agt  
       96  
       Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser  
           20                   25                   30  
 65      aat gga ttc cac tat ttg gat tgg tac ctt cag aag cca ggg cag tct  
       144  
       Asn Gly Phe His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser



ES 2 318 918 B1

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(714)

<223> Anticuerpo recombinante de cadena sencilla AD38

10 <400> 9

```

gag ctc gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca gga
48
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
15 1 5 10 15
gaa aga gcc acc ctc ttc tgc agg gcc agt cag gat att agc acc tcc
96
Glu Arg Ala Thr Leu Phe Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Ser
20 20 25 30
tta gcc tgg tat caa caa aaa cct ggc cag gtt ccc agg ctc ctc atc
144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu Ile
25 35 40 45
tat ggc aca tcc tat agg gcc act ggc atc tca gcc agg ttc agt ggc
192
Tyr Gly Thr Ser Tyr Arg Ala Thr Gly Ile Ser Ala Arg Phe Ser Gly
30 50 55 60
cgt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct
240
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
35 65 70 75 80
gaa gac ttt gca ttg tat tac tgt caa cac cgg agg gac tgg cct ccg
288
Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln His Arg Arg Asp Trp Pro Pro
40 85 90 95
ggg gcc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa ggt ggt tcc
336
Gly Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser
45 100 105 110
tct aga tct tcc gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc cta gtt
384
Ser Arg Ser Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
50 115 120 125
cag ccg ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt aca gcc tct gga ttc gtc
432
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Val
55 130 135 140
ttc agt gac tac tgg atg cac tgg gtc cgc caa gct cca ggg aag ggg
480
Phe Ser Asp Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
60 145 150 155 160
ctg gtt tgg att tca cgt ctt aag agt gat gga agt agt aga agt tat
528

```

ES 2 318 918 B1

Leu Val Trp Ile Ser Arg Leu Lys Ser Asp Gly Ser Ser Arg Ser Tyr  
 165 170 175  
 5 gcg gac ttt gtg aag ggc cga ttc acc gtc tcc aga gac aac gtc aag  
 576  
 Ala Asp Phe Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Val Lys  
 180 185 190  
 10 aat aca ctg ttt ttg caa atc aac agt ctg aga gcc gag gac acg gct  
 624  
 Asn Thr Leu Phe Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
 195 200 205  
 15 gtc tat tac tgt gca aga gag tta cgt ggc tgg tcc att gaa tat tgg  
 672  
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Arg Gly Trp Ser Ile Glu Tyr Trp  
 210 215 220  
 20 ggc cac gga act cag gtc acc gtc tcc tca gct tcc acc aag  
 714  
 Gly His Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 225 230 235  
 25  
 <210> 10  
 <211> 238  
 30 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 10  
 35 Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 40 Glu Arg Ala Thr Leu Phe Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 45 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 50 Tyr Gly Thr Ser Tyr Arg Ala Thr Gly Ile Ser Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 55 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 60 Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln His Arg Arg Asp Trp Pro Pro  
 85 90 95  
 65 Gly Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Ser Arg Ser Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
 115 120 125

ES 2 318 918 B1

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Val  
 130 135 140  
 5  
 Phe Ser Asp Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 145 150 155 160  
 10  
 Leu Val Trp Ile Ser Arg Leu Lys Ser Asp Gly Ser Ser Arg Ser Tyr  
 165 170 175  
 15  
 Ala Asp Phe Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Val Lys  
 180 185 190  
 20  
 Asn Thr Leu Phe Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
 195 200 205  
 25  
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Arg Gly Trp Ser Ile Glu Tyr Trp  
 210 215 220  
 30  
 Gly His Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 225 230 235

<210> 11  
 <211> 717  
 <212> DNA  
 35 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 40 <221> CDS  
 <222> (1)..(717)  
 <223> Anticuerpo recombinante de cadena sencilla AD64

45 <400> 11  
 gag ctc gtg atg act cag tct cca gtc tcc ctg gcc gtc acc cct gga  
 48  
 Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Ala Val Thr Pro Gly  
 50 1 5 10 15  
 gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg ttt agt  
 96  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser  
 55 20 25 30  
 aat gga ttc cac tat ttg gat tgg tac ctt cag aag cca ggg cag tct  
 144  
 60 Asn Gly Phe His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tcc agt cgg gcc tcc ggg gtc cct  
 192  
 65 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

ES 2 318 918 B1

5 gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc tca gat ttc aca ctg aaa atc  
 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 10 agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct  
 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 15 cta cat aat ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa  
 336  
 Leu His Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 20 ggt ggt tcc tct aga tct tcc gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga  
 384  
 Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly  
 115 120 125  
 25 ggc ttg gta aag ccg ggg ggg tcc ctc aga ctc tcc tgt gtc ggc tct  
 432  
 Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser  
 130 135 140  
 30 gga ttc act ttc act aat gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca  
 480  
 Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 145 150 155 160  
 35 ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc cgt atg aaa agc aag act tat ggc  
 528  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Met Lys Ser Lys Thr Tyr Gly  
 165 170 175  
 40 tgg aca aca gaa ttt gct aca gcc gtg gaa ggc aga ttc acc atg tca  
 576  
 Trp Thr Thr Glu Phe Ala Thr Ala Val Glu Gly Arg Phe Thr Met Ser  
 180 185 190  
 45 aga gat gat tca aaa aac aca ctc tat ttg caa atg aac agc ctg aaa  
 624  
 Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys  
 195 200 205  
 50 acc gag gac aca gcc gtg tat tat tgc tcc aca gat gac tat gat ttt  
 672  
 Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr Asp Asp Tyr Asp Phe  
 210 215 220  
 55 tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca gct tcc acc aag  
 717  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 225 230 235  
 60

<210> 12

<211> 239

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 318 918 B1

<400> 12

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

10           Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser  
                  20                           25                           30

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

20           Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro  
                  50                           55                           60

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

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

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

40           Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly  
                  115                           120                           125

45           Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser  
          130                           135                           140

50           Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro  
          145                           150                           155                           160

55           Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Met Lys Ser Lys Thr Tyr Gly  
                  165                           170                           175

60           Trp Thr Thr Glu Phe Ala Thr Ala Val Glu Gly Arg Phe Thr Met Ser  
                  180                           185                           190

65           Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys  
                  195                           200                           205

          Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr Asp Asp Tyr Asp Phe  
                  210                           215                           220

          Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
          230                           235



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 318 918

② Nº de solicitud: 200500753

③ Fecha de presentación de la solicitud: 01.04.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	WO 2005028511 A2 (CENTOCOR, INC.) 31.03.2005, página 2, líneas 15-33; página 61, línea 16 - página 62, línea 28; ejemplos 1-5; SEC. ID. NO. 59,69.	7-10, 12-15, 17-19 1-6,11
X A	WO 2004108895 A2 (NEURALAB LIMITED) 16.12.2004, página 2, línea 26 - página 3, línea 17; página 5; página 48, líneas 12-29; página 57, líneas 7-11; ejemplos 1-7; SEC. ID. NO. 2,4,7,10.	7-10, 12-15, 17-19 1-6,11
A	JIONG, C., SHI-ZHEN, W., YONG, P. et al. Cloning and expression of human single-chain Fv antibody against amyloid beta peptide involved in Alzheimer's disease. Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae. Octubre 2003, Vol. 25, Nº 5, páginas 557-562. ISSN 1000-503X, (resumen) Medline [en línea] [recuperado el 30.03.2009]. Recuperado de: EpoqueNet. Nº de acceso NLM14650158.	6,12-19
A	GEYLIS, V., MEINER, Z., BOGDANOVIC, N. et al. Human monoclonal antibodies against amyloid-beta (AB) engendered by EBV-immortalized lymphocytes from healthy adults. Neurobiology of Aging. Julio 2004, Vol. 25, página S585. ISSN 0197-4580.	12-19
A	EP 1172378 A1 (DODEL, R. & DU, Y.) 16.01.2002, todo el documento.	14-19
A	DU, Y., WEI, X., DODEL, R. et al. Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. Brain. Septiembre 2003, Vol. 126, Nº 9, páginas 1935-1939. ISSN 0006-8950.	14-19

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**  
30.03.2009

**Examinador**  
E. Relaño Reyes

**Página**  
1/3



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 318 918

② Nº de solicitud: 200500753

③ Fecha de presentación de la solicitud: 01.04.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RACKE, M. M., BOONE, L. I., HEPBURN, D. L. et al. Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. The Journal of Neuroscience. Enero 2005, Vol. 25, Nº 3, páginas 629-636. ISSN 0270-6474.	14,15, 17-19

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.03.2009

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

2/3

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)