



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 374**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/40 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)	C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)	C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)	C12N 5/10 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)	C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04720353 .4**

96 Fecha de presentación : **12.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1613347**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido beta amiloide.**

30 Prioridad: **12.03.2003 US 388389**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2010

73 Titular/es:
JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
Little Island Industrial Estate
Little Island, County Cork, IE
WYETH L.L.C.

72 Inventor/es: **Basi, Guriq y**
Saldanha, Jose, W.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Descripción

Antecedentes de la Invención

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad progresiva que produce demencia senil. Véase, en general, Selkoe, TINS 16: 403 (1993); Hardy y col., documento WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53: 438 (1994); Duff y col., Nature 373: 476 (1995); Games y col., Nature 373:523 (1995). En términos generales, la enfermedad se divide en dos categorías: de inicio tardío, que aparece a edad avanzada (más de 65 años), y de inicio temprano, que se desarrolla antes del período senil, es decir, entre los 35 y los 60 años. En los dos tipos de enfermedad la patología es igual, pero las anomalías tienen a ser más severas y generalizadas en casos que empiezan a una edad más temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, ovillos neurofibrilares y placas seniles. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau asociada a microtúbulos que consisten en dos filamentos retorcidos más o menos entre sí en parejas. Las placas seniles (es decir, placas de amiloide) son áreas de neurópilo desorganizado de hasta 150 μm de anchura con depósitos amiloides extracelulares en el centro que son visibles por análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. La acumulación de placas de amiloide dentro del cerebro también está asociada con el síndrome de Down y otros trastornos cognitivos.

El constituyente principal de las placas es un péptido denominado péptido A β o β -amiloide. El péptido A β es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de una glicoproteína transmembrana de mayor tamaño denominada proteína precursora de amiloide (APP). Como resultado del procesamiento proteolítico de la APP por diferentes enzimas secretasas, el A β se encuentra principalmente tanto en una forma corta, de 40 aminoácidos de longitud, como en una forma larga, que varía de 42-43 aminoácidos de longitud. Parte del dominio transmembrana hidrófobo de la APP se encuentra en el extremo carboxi de A β y puede justificar la capacidad de A β de agregarse en placas, particularmente en el caso de la forma larga. La acumulación de placas de amiloide en el cerebro finalmente conduce a la muerte de células neuronales. Los síntomas físicos asociados con este tipo de deterioro neural caracterizan la enfermedad de Alzheimer.

Varias mutaciones dentro de la proteína APP se han correlacionado con la presencia de enfermedad de Alzheimer. Véase, por ejemplo, Goate y col., Nature 349: 704) (1991) (valina⁷¹⁷ a isoleucina); Chartier Harlan y col. Nature 353: 844 (1991)) (valina⁷¹⁷ a glicina); Murrell y col., Science 254: 97 (1991) (valina⁷¹⁷ a fenilalanina); Mullan y col., Nature Genet. 1: 345 (1992) (una doble mutación que cambia lisina⁵⁹⁵-metionina⁵⁹⁶ por asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶). Se cree

que estas mutaciones producen la enfermedad de Alzheimer por un aumento o alteración del procesamiento de APP para dar A β , particularmente el procesamiento de APP para dar mayores cantidades de la forma larga de A β (es decir, A β 1-42 y A β 1-43). Se cree que mutaciones en otros genes, tales como los genes de presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente al procesamiento de APP para generar mayores cantidades de forma larga de A β (véase Hardy, TINS 20: 154 (1997)).

Se han usado modelos de ratón satisfactoriamente para determinar el significado de placas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Games y col., *supra*, Johnson-Wood y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1550 (1997)). En particular, cuando en ratones transgénicos PDAPP (que expresan una forma mutante de APP humana y desarrollan enfermedad de Alzheimer a una edad joven) se inyecta la forma larga de A β , presentan tanto una reducción en la progresión de la enfermedad de Alzheimer como un aumento en los títulos de anticuerpo contra el péptido A β (Schenk y col., Nature 400, 173 (1999)). Las observaciones analizadas anteriormente indican que A β , particularmente en su forma larga, es un elemento causante de la enfermedad de Alzheimer.

McMichael, documento EP 526.511, propone la administración de dosificaciones homeopáticas (menores o iguales a 10^{-2} mg/día) de A β a pacientes con AD preestablecida. En un ser humano típico con aproximadamente 5 litros de plasma, sería de esperar que incluso el límite superior de esta dosificación generara una concentración no mayor de 2 pg/ml. La concentración normal de A β en plasma humano típicamente está en el intervalo de 50-200 pg/ml (Seubert y col., Nature 359: 325 (1992)). Como la dosificación propuesta en el documento EP 526.511 apenas alteraría el nivel de A β circulante endógeno y como el documento EP 526.511 no recomienda el uso de un adyuvante como inmunoestimulante, parece inverosímil que se obtuviera algún efecto terapéutico beneficioso.

El documento WO 02/46237 proporciona agentes y procedimientos mejorados para enfermedades asociadas con depósitos amiloides de beta amiloide en el cerebro de un paciente. Los agentes preferidos incluyen ciertas variantes humanizadas y quiméricas del anticuerpo anti-beta amiloide 3D6 que comprende una región Fc de IgG1 humana de tipo silvestre.

Sin embargo, existe la necesidad de nuevas terapias y reactivos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en particular, de terapias y reactivos capaces de realizar un efecto terapéutico beneficioso a dosis fisiológicas (por ejemplo, no tóxicas).

Sumario de la Invención

La presente invención se ocupa de nuevos reactivos de anticuerpos terapéuticos como se menciona en las reivindicaciones para la prevención y tratamiento de enfermedades

amiloidogénicas (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer). Se describe la identificación y caracterización de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al péptido A β y es eficaz para reducir la carga de placas y/o reducir la distrofia neurítica asociada con trastornos amiloidogénicos. El análisis estructural y funcional de este anticuerpo conduce al diseño de diversos anticuerpos humanizados para uso profiláctico y/o terapéutico. En particular, se describe la humanización de las regiones variables de estos anticuerpos y cadenas de inmunoglobulina o anticuerpo humanizadas, inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados y fragmentos funcionales de inmunoglobulina o anticuerpo, en particular, fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos presentados.

Se desvela el uso de los anticuerpos en el tratamiento de enfermedades o trastornos amiloidogénicos (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), así como composiciones farmacéuticas y kits para uso en estas aplicaciones.

También se ocupa de procedimientos para identificar restos dentro de los anticuerpos monoclonales presentados que son importantes para una función inmunológica apropiada y para identificar restos que son susceptibles de sustitución en el diseño de anticuerpos humanizados que tienen mejores afinidades de unión y/o menor inmunogenicidad, cuando se usan como reactivos terapéuticos.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos humanizados) de la invención tienen funciones efectoras alteradas y usos terapéuticos.

Breve Descripción de los Dibujos

La *Figura 1* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpos 3D6 de ratón, 3D6 humanizado, Kabat ID 109230 y A19 de línea germinal. Las regiones CDR se indican por flechas. Las letras en negrita y en cursiva indican restos murinos raros. Las letras en negrita indican restos de empaquetamiento (VH+VL). El relleno sólido indica restos de interacción canónicos/CDR. Los asteriscos indican restos seleccionados para retromutación en 3D6 humanizado, versión 1.

La *Figura 2* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpos 3D6 de ratón, 3D6 humanizado, Kabat ID 045919 y VH3-23 de línea germinal. La anotación es igual que en el caso de la *Figura 1*.

La *Figura 3* representa gráficamente las propiedades de unión a A β de 3D6, 3D6 quimérico y 10D5. La *Figura 3A* es un gráfico que representa la unión a A β a 3D6 quimérico (PK1614) en comparación con 3D6 murino. La *Figura 3B* es un gráfico que representa la competición de 3D6 biotinilado frente a 3D6 no marcado, PK1614 y 10D5 con respecto a la unión a A β .

La *Figura 4* representa un modelo de homología de VH y VL de 3D6, que muestra el trazo

del esqueleto de α -carbono. VH se muestra como una línea punteada, y VL se muestra como una línea continua. Las regiones CDR se indican en forma de cinta.

La *Figura 5* representa gráficamente las propiedades de unión a A β de 3D6 quimérico y 3D6 humanizado. La *Figura 5A* representa resultados de ELISA que miden la unión de 3D6v1 humanizado y 3D6 quimérico a A β agregado. La *Figura 5B* representa resultados de ELISA que miden la unión de 3D6v1 y 3D6v2 humanizado a A β agregado.

La *Figura 6* es un gráfico que cuantifica la unión de 3D6 humanizado y 3D6 quimérico a placas de A β procedentes de secciones cerebrales de ratones PDAPP.

La *Figura 7* es un gráfico que muestra resultados de un ensayo de unión competitiva que ensaya la capacidad de las versiones 1 y 2 de 3D6 humanizado, 3D6 quimérico, 3D6 murino y 10D5 de competir con 3D6 murino por la unión a A β .

La *Figura 8* representa gráficamente un ensayo de fagocitosis *ex vivo* que ensaya la capacidad de 3D6v2 humanizado, 3D6 quimérico e IgG humana de mediar la captación de A β por células de microglía.

La *Figura 9* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VL de 10D5 y VL de 3D6. Las letras en negrita indican restos que coinciden exactamente con 10D5.

La *Figura 10* representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VH de 10D5 y VH de 3D6. Las letras en negrita indican restos que coinciden exactamente con 10D5.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se ocupa de nuevos reactivos inmunológicos como se menciona en las reivindicaciones para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades amiloidogénicas. Se describe la caracterización de inmunoglobulinas monoclonales, 3D6, eficaces en la unión de proteína beta amiloide (A β) (por ejemplo, la unión de A β soluble y/o agregada), que median la fagocitosis (por ejemplo, de A β agregada), reduciendo la carga de placas y/o reduciendo la distrofia neurítica (por ejemplo, en un paciente). También se describe la determinación y caracterización estructural de la estructura primaria y secundaria de las cadenas ligera y pesada variables de estas inmunoglobulinas y la identificación de restos importantes para la actividad e inmunogenicidad.

Las inmunoglobulinas incluyen una cadena pesada variable humanizada y una cadena ligera variable humanizada. Las cadenas ligera variable y pesada variable incluyen una región determinante de complementariedad (CDR) procedente de la inmunoglobulina monoclonal (por ejemplo, inmunoglobulina donadora) y regiones de marco conservado variables sustancialmente de una inmunoglobulina aceptora humana. La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina aceptora humana" significa que la mayoría o los restos de marco conservado

clave proceden de la secuencia aceptora humana, permitiendo sin embargo la sustitución de restos en ciertas posiciones por restos seleccionados para mejorar la actividad de la inmunoglobulina humanizada (por ejemplo, alterar la actividad de tal forma que imite más la actividad de la inmunoglobulina donadora) o seleccionados para reducir la inmunogenicidad de la inmunoglobulina humanizada.

La invención se ocupa de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable de 3D6 (por ejemplo, incluye tres CDR de la secuencia de región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 2 e incluye tres CDR de la secuencia de región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 4) e incluye una región de marco conservado variable sustancialmente procedente de una secuencia de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina aceptora humana, con la condición de que al menos un resto de marco conservado está sustituido por el resto de aminoácido correspondiente de la secuencia de región variable de cadena pesada o ligera de 3D6 de ratón, seleccionándose el resto de marco conservado entre el grupo constituido por (a) un resto que se une de forma no covalente al antígeno directamente; (b) un resto adyacente a una CDR; (c) un resto que interacciona con CDR (por ejemplo, identificado por modelado de la cadena ligera o pesada en la estructura resuelta de una cadena de inmunoglobulina homóloga conocida; y (d) un resto que participa en la interfaz VL-VH.

La invención se ocupa de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye CDR de región variable de 3D6 y regiones de marco conservado variables de una secuencia de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina aceptora humana, con la condición de que al menos un resto de marco conservado esté sustituido por el resto de aminoácido correspondiente de la secuencia de región variable de cadena ligera o pesada de 3D6 de ratón, siendo el resto de marco conservado un resto capaz de afectar a la conformación o función de la región variable de cadena ligera como se identifica por análisis de un modelo tridimensional de la región variable, por ejemplo un resto capaz de interaccionar con un antígeno, un resto próximo al sitio de unión a antígeno, un resto capaz de interaccionar con una CDR, un resto adyacente a una CDR, un resto dentro de 6 Å de un resto de CDR, un resto canónico, un resto de zona vernier, un resto de empaquetamiento intercatenario, un resto poco habitual, o un resto de sitio de glicosilación en la superficie del modelo estructural.

La invención se ocupa de una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada que incluye CDR de región variable de 3D6 (por ejemplo, de la secuencia de región variable de cadena ligera de 3D6 expuesta como SEC ID N°: 2) e incluye una región de marco conservado variable de inmunoglobulina aceptora humana, con la condición de que al menos un resto de

marco conservado seleccionado del grupo constituido por L1, L2, L36 y L46 (convención de numeración de Kabat) esté sustituido por el resto de aminoácido correspondiente de la secuencia de región variable de cadena ligera de 3D6 de ratón. En otra realización, la invención se ocupa de una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye CDR de región variable de 3D6 (por ejemplo, de la secuencia de región variable de cadena pesada de 3D6 expuesta como SEC ID N°: 4) e incluye una región de marco conservado variable de inmunoglobulina aceptora humana, con la condición de que al menos un resto de marco conservado seleccionado del grupo constituido por H49, H93 y H94 (convención de numeración de Kabat) esté sustituido por el resto de aminoácido correspondiente de la secuencia de región variable de cadena pesada de 3D6 de ratón.

Las cadenas ligeras preferidas incluyen regiones de marco conservado de kappa II del subtipo kappa II (convención de Kabat), por ejemplo, regiones de marco conservado de la inmunoglobulina aceptora Kabat ID 019230, Kabat ID 005131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID 005059, Kabat ID U21040 y Kabat ID U41645. Las cadenas pesadas preferidas incluyen regiones de marco conservado del subtipo III (convención de Kabat), por ejemplo, regiones de marco conservado de la inmunoglobulina aceptora Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 y Kabat ID M23691.

La invención se ocupa, además de las sustituciones descritas anteriormente, de una sustitución de al menos un resto de marco conservado humano raro. Por ejemplo, un resto raro puede sustituirse con un resto de aminoácido que es común para secuencias de cadena variable humana en esa posición. Como alternativa, un resto raro puede sustituirse con un resto de aminoácido de una secuencia de cadena variable de línea germinal homóloga correspondiente (por ejemplo, un resto de marco conservado de cadena ligera raro puede sustituirse por un resto de línea germinal correspondiente de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal A1, A17, A18, A2 o A19 o un resto de marco conservado de cadena pesada raro puede sustituirse por un resto de línea germinal correspondiente de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 o VH3-11).

La invención se ocupa de una inmunoglobulina humanizada que incluye una cadena ligera y una cadena pesada, como se ha descrito anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de dicha inmunoglobulina. En una realización ejemplar, la inmunoglobulina humanizada se une (por ejemplo, se une específicamente) al péptido beta amiloide ($A\beta$) con una afinidad de unión de al menos $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$ o $10^9 M^{-1}$. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno incluye una cadena pesada que tiene el isotipo $\gamma 1$. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno se une (por ejemplo, se une específicamente) tanto al péptido beta amiloide ($A\beta$) soluble como al $A\beta$

agregado. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno media la fagocitosis (por ejemplo, induce la fagocitosis) del péptido beta amiloide (A β). En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno atraviesa la barrera hematoencefálica en un sujeto. En otra realización, la inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno reduce tanto la carga de péptido beta amiloide (A β) como la distrofia neurítica en un sujeto.

En otra realización, la invención se ocupa de inmunoglobulinas quiméricas que incluyen regiones variables de 3D6 (por ejemplo, las secuencias de región variable expuestas como SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4). Como se usa en el presente documento, una secuencia de anticuerpo o de inmunoglobulina que comprende una secuencia de VL y/o VH como se expone, por ejemplo, en la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 puede comprender la secuencia de VL o VH completa o puede comprender la secuencia de VL o VH madura (es decir, el péptido maduro sin el péptido señal o líder). En otra realización, la invención se ocupa de una inmunoglobulina, o fragmento de unión a antígeno de la misma, que incluye una región de cadena pesada variable como se expone en la SEC ID N°: 8 y una región de cadena ligera variable como se expone en la SEC ID N°: 5. En otra realización, la invención se ocupa de una inmunoglobulina, o fragmento de unión a antígeno de la misma, que incluye una región de cadena pesada variable como se expone en la SEC ID N°: 12 y una región de cadena ligera variable como se expone en la SEC ID N°: 11.

Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento son particularmente adecuadas para uso en procedimientos terapéuticos destinados a prevenir o tratar enfermedades amiloidogénicas. En una realización, la invención se ocupa de un uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad amiloidogénica (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer) que implica administrar al paciente una dosificación eficaz de una inmunoglobulina humanizada como se describe en el presente documento. En otra realización, la invención se ocupa de composiciones farmacéuticas que incluyen una inmunoglobulina humanizada como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéutico. También se ocupa de moléculas de ácido nucleico aisladas, vectores y células huésped para producir las inmunoglobulinas o fragmentos o cadenas de inmunoglobulina descritas en el presente documento, así como de procedimientos para producir dichas inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulina o cadenas de inmunoglobulina.

La inmunoglobulina de la invención tiene una región Fc alterada, en la que al menos un resto de aminoácido de la región Fc se ha reemplazado por un resto o cadena lateral diferente. En una realización, la inmunoglobulina modificada es de la clase IgG, y comprende al menos un reemplazo de resto de aminoácido en la región Fc de tal forma que la inmunoglobulina tiene

una función efectora alterada, por ejemplo, en comparación con una inmunoglobulina no modificada. En realizaciones particulares, la inmunoglobulina de la invención tiene una función efectora alterada de tal forma que es menos inmunogénica (por ejemplo, no provoca una actividad de células efectoras indeseada, lisis o unión al complemento), tiene mejores propiedades de eliminación de amiloide y/o tiene una semivida deseable.

Antes de describir la invención, puede ser útil para su comprensión la exposición de definiciones de ciertos términos que se usarán en lo sucesivo.

El término “inmunoglobulina” o “anticuerpo” (usados indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína de unión a antígeno que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas constituido por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas se pliegan en dominios. El término “dominio” se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (por ejemplo, que comprende de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizada, por ejemplo, por una lámina β y/o enlaces disulfuro intracatenarios. Los dominios se denominan adicionalmente en el presente documento “constantes” o “variables”, basándose en la ausencia relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio “constante”, o la variación significativa dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio “variable”. Los dominios “constantes” en la cadena ligera se denominan indistintamente “regiones constantes de cadena ligera”, “dominios constantes de cadena ligera”, regiones “CL” o dominios “CL”. Los dominios “constantes” en la cadena pesada se denominan indistintamente “regiones constantes de cadena pesada”, “dominios constantes de cadena pesada”, regiones “CH” o dominios “CH”. Los dominios “variables” en la cadena ligera se denominan indistintamente “regiones variables de cadena ligera”, “dominio variables de cadena ligera”, regiones “VL” o dominios “VL”. Los dominios “variables” en la cadena pesada se denominan indistintamente “regiones constantes de cadena pesada”, “dominios constantes de cadena pesada”, regiones “CH” o dominios “CH”.

El término “región” se refiere a una parte o porción de una cadena de anticuerpo e incluye dominios constantes o variables como se define en el presente documento, así como partes o porciones más discretas de dichos dominios. Por ejemplo, los dominios o regiones variables de cadena ligera incluyen “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR” intercaladas entre “regiones de marco conservados” o “FR”, como se define en el presente documento.

Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden existir en forma monomérica o polimérica.

La expresión “fragmento de unión a antígeno” se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a un antígeno o compete con un anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que procede) por la unión al antígeno (es decir, unión específica). El término “conformación” se refiere a la estructura terciaria de una proteína o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo, cadena de anticuerpo, dominio o región del mismo). Por ejemplo, la frase “conformación de cadena ligera (o pesada)” se refiere a la estructura terciaria de una región variable de cadena ligera (o pesada) y la frase “conformación de anticuerpo” o “conformación de fragmento de anticuerpo” se refiere a la estructura terciaria de un anticuerpo o fragmento del mismo.

“Unión específica” de un anticuerpo significa que el anticuerpo presenta una afinidad apreciable por el antígeno o un epítipo preferido y, preferentemente, no presenta reactividad cruzada significativa. Una unión “apreciable” o preferida incluye la unión con una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} . Son más preferidas afinidades mayores de 10^7 M^{-1} , preferentemente mayores de 10^8 M^{-1} . También se pretende que estén dentro del ámbito de la presente invención valores intermedios de los expuestos en el presente documento y puede indicarse una afinidad de unión preferida como un intervalo de afinidades, por ejemplo, de 10^6 a 10^{10} M^{-1} , preferentemente de 10^7 a 10^{10} M^{-1} , más preferentemente de 10^8 a 10^{10} M^{-1} . Un anticuerpo que “no presenta una reactividad cruzada significativa” es uno que no se unirá apreciablemente a una entidad indeseable (por ejemplo, una entidad proteica indeseable). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a A β se unirá apreciablemente a A β pero no reaccionará de forma significativa con proteínas o péptidos que no son A β (por ejemplo, proteínas o péptidos que no son A β incluidos en placas). Un anticuerpo específico por un epítipo preferido, por ejemplo, no presentará reacción cruzada de forma significativa con epítopos remotos en la misma proteína o péptido. La unión específica puede determinarse de acuerdo con cualquier medio reconocido en la técnica para determinar dicha unión. Preferentemente, la unión específica se determina de acuerdo con el análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

Los fragmentos de unión se producen por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cadenas individuales y anticuerpos monocatenarios. Exceptuando las inmunoglobulinas o anticuerpos “bienespecíficos” o “bifuncionales”, se entiende que una inmunoglobulina o anticuerpo tiene todos sus sitios de unión idénticos. Un “anticuerpo bienespecífico” o “anticuerpo bifuncional” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos pueden producirse por una diversidad de procedimientos que incluyen la fusión

de hibridomas o la asociación de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

La expresión "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una
5 inmunoglobulina o un anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). La expresión "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizado" (es decir, una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es
10 decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región de marco conservado variable sustancialmente procedente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano, y además incluye regiones
15 constantes (por ejemplo, al menos una región constante o parte de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferentemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). La expresión "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región de marco conservado variable sustancialmente procedente de
20 una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

La frase "sustancialmente procedente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que, cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina o anticuerpo humano con fines comparativos, la región comparte al menos
25 un 80-90%, preferentemente un 90-95%, más preferentemente un 95-99% de identidad (es decir, identidad de secuencia local) con la secuencia de región constante o de marco conservado humana, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones y similares. La introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia consenso,
30 sustituciones de línea germinal, retromutaciones y similares, con frecuencia se denomina "optimización" de un anticuerpo o cadena humanizada. La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano" o "sustancialmente no humano" significa que tiene una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo con al menos un 80-95%, preferentemente un 90-95%, más preferentemente un 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la de un organismo
35 no humano, por ejemplo, un mamífero no humano.

Por consiguiente, todas las regiones o restos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticos a las regiones o restos correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativas. La expresión “región correspondiente” o “resto correspondiente” se refiere a una región o resto en una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que ocupa la misma posición (es decir, equivalente) que una región o resto en una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos, cuando la primera y segunda secuencias se alinean óptimamente con fines comparativos.

Las expresiones “inmunoglobulina humanizada” o “anticuerpo humanizado” no pretenden incluir inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define más adelante. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (es decir, comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden restos de CDR donadoras y restos de regiones de marco conservado aceptoras) no encontradas en las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define en el presente documento.

La expresión “identidad significativa” significa que dos secuencias polipeptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos un 50-60% de identidad de secuencia, preferentemente un 60-70% de identidad de secuencia, más preferentemente un 70-80% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 80-90% de identidad, incluso más preferentemente al menos un 90-95% de identidad e incluso más preferentemente al menos un 95% de identidad de secuencia o más (por ejemplo, un 99% de identidad de secuencia o más). La expresión “identidad sustancial” significa que dos secuencias polipeptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos un 80-90% de identidad de secuencia, preferentemente un 90-95% de identidad de secuencia y más preferentemente al menos un 95% de identidad de secuencia o más (por ejemplo, un 99% de identidad de secuencia o más). Para la comparación de las secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se diseñan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se diseñan parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias después calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros diseñados del programa. Las expresiones “identidad de secuencia” e “identidad de secuencia” se usan indistintamente en el

presente documento.

El alineamiento óptimo de secuencias con fines comparativos puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), por aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase, en general, Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de la secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990). El software para realizar el análisis BLAST está disponible para el público por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (accesible para el público por el servidor de internet del NCBI de los Institutos Nacionales de la Salud). Típicamente, pueden usarse parámetros del programa por defecto para realizar la comparación de las secuencias, aunque también pueden usarse parámetros adaptados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Con el objetivo de clasificar sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (restos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Preferentemente, las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados se unen al antígeno con una afinidad que está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco con respecto al anticuerpo no humano correspondiente. Por ejemplo, si el anticuerpo no humano tiene una afinidad de unión de 10^9 M^{-1} , los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de unión de al menos $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o 10^9 M^{-1} . Cuando se describen las propiedades de unión de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo, la cadena puede describirse basándose en su capacidad de

“unión directa al antígeno (por ejemplo, A β)”. Se dice que una cadena tiene “unión directa al antígeno” cuando confiere a una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) una propiedad de unión específica o afinidad de unión. Se dice que una mutación (por ejemplo, una retromutación) afecta sustancialmente a la capacidad de una cadena pesada o ligera de realizar una unión directa al antígeno si afecta a (por ejemplo, reduce) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena al menos en un orden de magnitud en comparación con la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación. Una mutación “no afecta sustancialmente (por ejemplo, reduce) la capacidad de una cadena de realizar una “unión directa al antígeno” si afecta a (por ejemplo, reduce) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende dicha cadena sólo en un factor de dos, tres o cuatro con respecto a la del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación.

La expresión anticuerpo o “inmunoglobulina quimérica” se refiere a un anticuerpo o inmunoglobulina cuyas regiones variables proceden de una primera especie y cuyas regiones constantes proceden de una segunda especie. Pueden construirse inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, por ejemplo, por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

Un “antígeno” es una entidad (por ejemplo, una entidad o péptido proteico) al que se une específicamente un anticuerpo.

El término “epítope” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo). Pueden formarse epítopes a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopes formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen tras la exposición a disolventes de desnaturalización mientras que los epítopes formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con disolventes de desnaturalización. Un epítope típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de epítopes incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epítope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Pueden identificarse anticuerpos que reconocen el mismo epítope en un inmunoensayo

sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como A β . Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto (RIA) en fase sólida, inmunoensayo enzimático directo o indirecto (EIA) en fase sólida, ensayo competitivo tipo sándwich (véase Stahl y col., *Methods in Enzymology* 9: 242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland y col., *J. Immunol.* 137: 3614 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo tipo sándwich marcado director en fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA con marcador directo en fase sólida usando I-125 como marcador (véase Morel y col., *Mol. Immunol.* 25(1): 7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung y col., *Virology* 176: 546 (1990)); y RIA marcado directo. (Moldenhauer y col., *Scand. J. Immunol.* 32: 77 (1990)). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o a células que llevan cualquiera de éstos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Normalmente, cuando está presente un anticuerpo competitivo en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común al menos en un 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% o más.

Un epítipo también se reconoce por células inmunológicas, por ejemplo, linfocitos B y/o linfocitos T. El reconocimiento celular de un epítipo puede determinarse por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se determina por la incorporación de ³H-timidina, por secreción de citocinas, por secreción de anticuerpos, o por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos).

Pueden encontrarse epítopes o determinantes antigénicos ilustrativos dentro de la proteína precursora de amiloide (APP) humana, pero preferentemente se encuentran dentro del péptido A β de APP. Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. A los aminoácidos dentro de APP se les asignan números de acuerdo con la secuencia de la isoforma APP⁷⁷⁰ (véase, por ejemplo, GenBank, N° de Acceso P05067, también expuesta como SEC ID N°: 38). El péptido A β (también denominado en el presente documento péptido beta amiloide y A-beta) es un fragmento interno de ~4 kDa de 39-43 aminoácidos de APP (A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43). A β 40, por ejemplo, consiste en los restos 672-711 de APP y A β 42 consiste en los restos 673-713 de APP. Como resultado del procesamiento proteolítico

de APP por diferentes enzimas secretadas *in vivo* o *in situ*, A β se encuentra tanto en una “forma corta”, de 40 aminoácidos de longitud, como en una “forma larga”, que varía de 42-43 aminoácidos de longitud. Los epítopes o determinantes antigénicos preferidos, como se describe en el presente documento, están localizados dentro del extremo N del péptido A β e incluyen restos dentro de los aminoácidos 1-10 de A β , preferentemente de los restos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 ó 3-7 de A β 42. Otros epítopes o determinantes antigénicos mencionados incluyen los restos 2-4, 5, 6, 7 u 8 de A β , restos 3-5, 6, 7, 8 ó 9 de A β o restos 4-7, 8, 9 ó 10 de A β 42.

La expresión “enfermedad amiloidogénica” incluye cualquier enfermedad asociada con (o causada por) la formación o deposición de fibrillas amiloides insolubles. Las enfermedades amiloidogénicas ejemplares incluyen, pero sin limitación, amiloidosis sistémica, enfermedad de Alzheimer, diabetes de inicio en la madurez, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia fronto-temporal, y encefalopatías espongiiformes transmisibles relacionadas con priones (kuru y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en seres humanos y tembladera y BSE en ganado ovino y bovino, respectivamente). Las diferentes enfermedades amiloidogénicas se definen o caracterizan por la naturaleza del componente polipeptídico de las fibrillas depositadas. Por ejemplo, en sujetos o pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer, la proteína β -amiloide (por ejemplo, de tipo silvestre, variante o proteína β -amiloide truncada) es el componente polipeptídico de caracterización del depósito amiloide. Por consiguiente, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una “enfermedad caracterizada por depósitos de A β ” o una “enfermedad asociada con depósitos de A β ”, por ejemplo, en el cerebro de un sujeto o paciente. Las expresiones “proteína β -amiloide”, “péptido β -amiloide”, “ β -amiloide”, “A β ” y “péptido A β ” se usan indistintamente en el presente documento.

La expresión “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se define como una cantidad suficiente para conseguir o al menos conseguir parcialmente el efecto deseado. La expresión “dosis terapéuticamente eficaz” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y el estado general del propio sistema inmune del paciente.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

A β “soluble” o “disociado” se refiere al polipéptido A β sin agregación o desagregado. A β “insoluble” se refiere al polipéptido A β en agregación, por ejemplo, A β que se mantiene unido por enlaces no covalentes. Se cree que A β (por ejemplo, A β 42) se agrega, al menos en parte, debido a la presencia de restos hidrófobos en el extremo C del péptido (parte del dominio transmembrana de APP). Un procedimiento para preparar A β soluble es disolver el péptido

lío filizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante se centrifuga para retirar cualquier partícula insoluble.

La expresión “función efectora” se refiere a una actividad que reside en la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) e incluye, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo de unirse a moléculas efectoras tales como receptores del complemento y/o de Fc, que pueden controlar varias funciones inmunes del anticuerpo tales como la actividad de células efectoras, la lisis, la actividad mediada por el complemento, la eliminación de anticuerpos y la semivida de anticuerpos.

La expresión “molécula efectora” se refiere a una molécula que es capaz de unirse a la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyendo, pero sin limitación, una proteína del complemento o un receptor de Fc.

La expresión “célula efectora” se refiere a una célula capaz de unirse a la parte de Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) típicamente a través de un receptor de Fc expresado en la superficie de la célula efectora incluyendo, pero sin limitación, linfocitos, por ejemplo, células presentadoras de antígeno y linfocitos T.

La expresión “región Fc” se refiere a una región C-terminal de un anticuerpo IgG, en particular, la región C-terminal de la cadena o cadenas pesadas de dicho anticuerpo IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, una región Fc típicamente se define como una región que abarca desde aproximadamente el resto de aminoácido Cys226 hasta el extremo carboxilo de una o más cadenas pesadas de IgG.

La expresión “numeración de Kabat”, a menos que se indique otra cosa, se define como la numeración de los restos, por ejemplo, en un anticuerpo de cadena pesada de IgG usando el índice EU como en Kabat y col. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, Md. (1991)).

La expresión “receptor de Fc” o “FcR” se refiere a un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Los receptores de Fc típicos que se unen a una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyen, pero sin limitación, receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Se revisan receptores de Fc en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995).

I. Reactivos Inmunológicos y Terapéuticos

Los reactivos inmunológicos y terapéuticos de la invención comprenden o consisten en inmunógenos o anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno o funcionales de los mismos,

como se define en el presente documento. Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente de 25 kDa) y una cadena “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda y tienen una longitud de aproximadamente 230 restos. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) o épsilon (ϵ), tienen aproximadamente 450-600 restos de longitud, y definen el isotipo de anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Tanto la cadena pesada como la cadena ligera se pliegan en dominios. El término “dominio” se refiere a una región globular de una proteína, por ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo. Los dominios de inmunoglobulina o anticuerpo incluyen, por ejemplo, 3 o cuatro bucles peptídicos estabilizados por una lámina β y un enlace disulfuro intercatenario. Las cadenas ligeras intactas tienen, por ejemplo, dos dominios (V_L y C_L) y las cadenas pesadas intactas tienen, por ejemplo, cuatro o cinco dominios (V_H , C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}).

Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante se unen por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región “D” de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase, en general, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989), Ch. 7).

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión a anticuerpo. De esta manera, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones de marco conservado “framework” relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementaridad o CDR. Las cadenas naturales o cadenas producidas de forma recombinante pueden expresarse con una secuencia líder que se retira durante el procesamiento celular para producir una cadena madura. Las cadenas maduras también pueden producirse de forma recombinante teniendo una secuencia líder no natural, por ejemplo, para aumentar la secreción o alterar el procesamiento de una cadena particular de interés.

Las CDR de las dos cadenas maduras de cada par se alinean por las regiones de marco conservados, permitiendo la unión a un epítoto específico. Desde el extremo N al

extremo C, tanto la cadena ligera como la cadena pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. "FR4" también se denomina en la técnica región D/J de la cadena pesada variable y la región J de la cadena ligera variable. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Institutos Nacionales de la Salud, Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991). Se ha propuesto una definición estructural alternativa por Chothia y col., J. Mol. Biol. 196: 901 (1987); Nature 342: 878 (1989); y J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (denominado colectivamente en lo sucesivo "Chothia y col.").

A. Anticuerpos contra A β

Los agentes terapéuticos de la invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente a A β u otro componente de placas de amiloide. Estos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de estos anticuerpos se unen específicamente a la forma agregada de A β sin unirse a la forma soluble. Algunos se unen específicamente a la forma soluble sin unirse a la forma agregada. Algunos se unen tanto a la forma agregada como a la forma soluble. Algunos de estos anticuerpos se unen a una forma corta natural de A β (es decir, A β 39, 40 ó 41) sin unirse a una forma larga natural de A β (es decir, A β 42 y A β 43). Algunos anticuerpos se unen a una forma larga de A β sin unirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se unen a A β sin unirse a la proteína precursora de amiloide de longitud completa. Los anticuerpos usados en procedimientos terapéuticos preferentemente tienen una región constante intacta o al menos suficiente de la región constante para interaccionar con un receptor de Fc. Se prefiere el isotipo IgG1 humano porque tiene la máxima afinidad de los isotipos humanos por el receptor FcRI en células fagocíticas. También pueden usarse fragmentos Fab biespecíficos en los que un brazo del anticuerpo tiene especificidad por A β , y el otro por un receptor de Fc. Los anticuerpos preferidos se unen a A β con una afinidad de unión mayor que (o igual a) aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ó 10^{10} M⁻¹ (incluyendo afinidades intermedias de estos valores).

Los sueros policlonales típicamente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a varios epítopes a lo largo de la longitud de A β . Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos para un segmento particular de A β , tal como A β 1-10. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo específico dentro de A β que puede ser un epítipo conformacional o no conformacional. La eficacia profiláctica y terapéutica de anticuerpos puede ensayarse usando los procedimientos de modelo de animal transgénico descritos en los Ejemplos. Los anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo dentro de los restos 1-10 de A β (designándose el primer resto N terminal de A β natural 1). Algunos anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo dentro de los aminoácidos 1-5, y otros a un

epítope dentro de 5-10. Algunos anticuerpos preferidos se unen a epítopes dentro de los aminoácidos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 ó 3-7. Algunos anticuerpos preferidos se unen a un epítope empezando en los restos 1-3 y terminando en los restos 7-10 de A β . Los anticuerpos menos preferidos incluyen los que se unen a epítopes con restos 10-15, 15-20, 25-30, 10-20, 20, 30 ó 10-25 de A β . Se recomienda que estos anticuerpos se exploren con respecto a la actividad en los modelos de ratón descritos en los Ejemplos antes del uso. Por ejemplo, se ha descubierto que ciertos anticuerpos contra epítopes dentro de los restos 10-18, 16-24, 18-21 y 33-42 carecen de actividad (por ejemplo, carecen de la capacidad de reducir la carga de placas y/o resolver la patología neurítica asociada con la enfermedad de Alzheimer). En algunos procedimientos se usan anticuerpos monoclonales múltiples que tienen especificidades de unión por diferentes epítopes. Dichos anticuerpos pueden administrarse de forma secuencial o simultánea. También pueden usarse (por ejemplo, administrarse o coadministrarse) anticuerpos contra componentes amiloides distintos de A β . Por ejemplo, pueden dirigirse anticuerpos a la proteína asociada a amiloide sinucleína.

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítope dentro de restos especificados, tales como A β 1-5, por ejemplo, lo que significa es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los restos especificados (es decir, A β 1-5 en este ejemplo). Dicho anticuerpo no necesariamente contacta con todos los restos dentro de A β 1-5. Ni todas las sustituciones o deleciones de un solo aminoácido dentro de A β 1-5 necesariamente afectan de forma significativa a la afinidad de unión. La especificidad de epítope de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, formando una biblioteca de presentación en fagos en la que diferentes miembros presentan diferentes subsecuencias de A β . La biblioteca de presentación en fagos después se selecciona con respecto a miembros que se unen específicamente a un anticuerpo bajo ensayo. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente, dicha familia contiene una secuencia central común, y diversas longitudes de secuencias de marco conservado en diferentes números. La secuencia central más corta que muestra unión específica al anticuerpo define el epítope unido por el anticuerpo. También pueden ensayarse anticuerpos con respecto a la especificidad de epítope en un ensayo competitivo con un anticuerpo cuya especificidad de epítope ya se ha determinado. Por ejemplo, anticuerpos que compiten con el anticuerpo 3D6 por la unión a A β se unen al mismo epítope o a epítopes similares al de 3D6, es decir, dentro de los restos A β 1-5. La exploración de anticuerpos con respecto a la especificidad de epítope es un indicador útil de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha determinado que se une a un epítope dentro de los restos 1-7 de A β probablemente será eficaz para prevenir y tratar la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con las metodologías de la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a un segmento preferido de A β sin unirse a otras regiones de A β tienen varias ventajas con respecto a anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o sueros policlonales contra A β intacto. En primer lugar, para dosificaciones de masa iguales, las dosificaciones de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una mayor dosificación molar de anticuerpos eficaces para eliminar placas de amiloide. En segundo lugar, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación contra depósitos amiloides sin inducir una respuesta de eliminación contra el polipéptido APP intacto, reduciendo de esta manera los efectos secundarios potenciales.

1. Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

La presente invención se refiere a anticuerpos quiméricos y/o humanizados (es decir, inmunoglobulinas quiméricas y/o humanizadas) específicos para el péptido beta amiloide. Los anticuerpos quiméricos y/o humanizados tienen una especificidad de unión o afinidad igual o similar a la de un anticuerpo de ratón u otro anticuerpo no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado.

A. Producción de Anticuerpos Quiméricos

La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 e IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Por lo tanto, un anticuerpo quimérico típico es una proteína híbrida constituido por el dominio de unión a antígeno o V de un anticuerpo de ratón y el dominio efector o C de un anticuerpo humano.

B. Producción de Anticuerpos Humanizados

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una cadena que comprende restos de marco conservado de región variable sustancialmente de una cadena de anticuerpo humano (denominada inmunoglobulina o anticuerpo aceptor) y al menos una región determinante de complementaridad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (denominado inmunoglobulina o anticuerpo donador). Véase, Queen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989), documentos US 5.530.101, US 5.585.089, US 5.693.761, US 5.693.762, Selick y col., documento WO 90/07861 y Winter, documento US 5.225.539. La región o regiones constantes, si están presentes, también proceden sustancial o enteramente de una inmunoglobulina humana.

La sustitución de CDR de ratón en una región de marco conservado de dominio variable humano seguramente dará como resultado la retención de su orientación espacial correcta si la región de marco conservado del dominio variable humano adopta una conformación igual o similar a la región de marco conservado variable de ratón de la que procedían las CDR. Esto se consigue obteniendo los dominios variables humanos a partir de anticuerpos humanos cuyas secuencias de marco conservado presentan un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de marco conservado variables murinos de los que se obtuvieron las CDR. Las regiones de marco conservado variables de cadena ligera y pesada pueden proceder de secuencias de anticuerpo humano iguales o diferentes. Las secuencias de anticuerpo humano pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos naturales o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Kettleborough y col., Protein Engineering 4: 773 (1991); Kolbinger y col., Protein Engineering 6: 971 (1993) y Carter y col., documento WO 92/22653.

Habiendo identificado las regiones determinantes de complementaridad de la inmunoglobulina donadora murina y las inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa es determinar qué restos, si los hay, de estos componentes deben sustituirse para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En general, debe minimizarse la sustitución de restos de aminoácidos humanos con murinos, porque la introducción de restos murinos aumenta el riesgo de que el anticuerpo induzca una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) en seres humanos. Pueden realizarse procedimientos reconocidos en la técnica para determinar respuestas inmunes para controlar una respuesta HAMA en un paciente particular o durante ensayos clínicos. Los pacientes a los que se han administrado anticuerpos humanizados pueden someterse a una evaluación de inmunogenicidad al principio y a lo largo de la administración de dicha terapia. La respuesta HAMA se mide, por ejemplo, detectando anticuerpos contra el reactivo terapéutico humanizado en muestras de suero del paciente usando un procedimiento conocido por un experto en la materia, incluyendo tecnología de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) y/o análisis ELISA en fase sólida.

Ciertos aminoácidos de los restos de marco conservado de región variable humana se seleccionan para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de las CDR y/o la unión al antígeno. La yuxtaposición no natural de regiones CDR murinas con una región de marco conservado variable humana puede dar como resultado limitaciones conformacionales no naturales que, a menos que se corrijan con la sustitución de ciertos restos de aminoácidos, conducen a una pérdida de afinidad de unión.

La selección de restos de aminoácidos para la sustitución se determina, en parte, por

creación de modelos informáticos. En el presente documento se describe el hardware y el software informático para producir imágenes tridimensionales de moléculas de inmunoglobulina. En general, los modelos moleculares se producen a partir de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o dominios de las mismas. Las cadenas a modelar se comparan con respecto a la similitud de secuencias de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que muestran la mayor similitud de secuencia se seleccionan como puntos de partida para la construcción del modelo molecular. Para la creación de modelos se seleccionan cadenas o dominios que comparten al menos un 50% de identidad de secuencia, y preferentemente los que comparten al menos un 60%, 70%, 80% y 90% de identidad de secuencia o más. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas o dominios de inmunoglobulina que se están modelando, y los de la estructura de partida. Las estructuras modificadas después se ensamblan en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina por minimización de energía y por verificación de que todos los átomos están dentro de las distancias apropiadas entre sí y que las longitudes de los enlaces y los ángulos están dentro de los límites aceptables químicamente.

La selección de restos de aminoácidos para la sustitución también puede determinarse, en parte, por examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto de marco conservado de región variable murina y un resto de marco conservado de región variable humana seleccionado, el aminoácido de marco conservado humano normalmente debe sustituirse por el aminoácido de marco conservado equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una de forma no covalente al antígeno directamente,
- (2) sea adyacente a una región CDR,
- (3) interaccione de otra manera con una región CDR (por ejemplo, esté dentro de aproximadamente 3-6 Å de una región CDR como se determina por modelado informático), o
- (4) participe en la interfaz VL-VH.

Los restos que “se unen de forma no covalente al antígeno directamente” incluyen aminoácidos en posiciones en regiones de marco conservado que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con aminoácidos en el antígeno de acuerdo con las fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, por formación de enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas y similares.

Las regiones CDR y de marco conservado son como se definen por Kabat y col. o Chothia y col. *supra*. Cuando restos de marco conservados, como se definen por Kabat y col., *supra*, constituyen restos de bucles estructurales como se define por Chothia y col. *supra*, los aminoácidos presentes en el anticuerpo de ratón pueden seleccionarse para la sustitución en el anticuerpo humanizado. Los restos que son “adyacentes a una región CDR” incluyen restos de aminoácidos en posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las CDR en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, en posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR como se define por Kabat, o una CDR como se define por Chothia (véase, por ejemplo Chothia y Lesk JMB 196: 901 (1987)). Es particularmente probable que estos aminoácidos interaccionen con los aminoácidos en las CDR y, si se eligen a partir del aceptor, distorsionen las CDR del donador y reduzcan la afinidad. Además, los aminoácidos adyacentes pueden interaccionar directamente con el antígeno (Amit y col., Science, 233: 747 (1986)) y puede ser deseable la selección de estos aminoácidos del donador para mantener todos los contactos de antígeno que proporcionan afinidad en el anticuerpo original.

Los restos que “interaccionan de otra manera con una región CDR” incluyen los que se ha determinado por análisis estructural secundario que están en una orientación espacial suficiente para realizar una región CDR. En una realización, los restos que “de otra manera interaccionan con una región CDR” se identifican mediante el análisis de un modelo tridimensional de la inmunoglobulina donadora (por ejemplo, un modelo generado por ordenador). Un modelo tridimensional, típicamente del anticuerpo donador original, muestra que ciertos aminoácidos fuera de las CDR están próximos a las CDR y tienen una buena probabilidad de interaccionar con aminoácidos en las CDR por la formación de enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En esas posiciones de aminoácidos, puede seleccionarse el aminoácido de la inmunoglobulina donadora en lugar del aminoácido de la inmunoglobulina aceptora. Los aminoácidos de acuerdo con este criterio generalmente tendrán un átomo de cadena lateral dentro de aproximadamente 3 ángstrom (Å) de algún átomo en las CDR y debe contener un átomo que pueda interaccionar con los átomos de CDR de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, tales como las indicadas anteriormente.

En el caso de átomos que pueden formar un enlace de hidrógeno, los 3 Å se miden entre sus núcleos, pero en el caso de átomos que no forman un enlace, los 3 Å se miden entre sus superficies de Van der Waals. Por lo tanto, en el último caso, los núcleos tienen que estar dentro de aproximadamente 6 Å (3 Å más la suma de los radios de Van der Waals) para los átomos que se consideran capaces de interaccionar. En muchos casos, los núcleos estarán

separados aproximadamente 4 ó 5 a 6 Å. Para determinar si un aminoácido puede interaccionar con las CDR, se prefiere no considerar los últimos 8 aminoácidos de la CDR 2 de cadena pesada como parte de las CDR, porque desde el punto de vista de la estructura, estos 8 aminoácidos se comportan más como parte de la región de marco conservado.

5 Los aminoácidos que son capaces de interaccionar con aminoácidos en las CDR pueden identificarse de otra manera más. El área de superficie accesible al disolvente de cada aminoácido de marco conservado se calcula de dos maneras: (1) en el anticuerpo intacto, y (2) en una molécula hipotética constituido por el anticuerpo con su CDR retirada. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente 10 ángstrom al cuadrado o más
10 muestra que el acceso del aminoácido de marco conservado al disolvente está bloqueado al menos parcialmente por las CDR, y por lo tanto que el aminoácido está haciendo contacto con las CDR. Las áreas de superficie accesible al disolvente de un aminoácido pueden calcularse basándose en un modelo tridimensional de un anticuerpo, usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Connolly, J. Appl. Cryst. 16: 548 (1983) y Lee y Richards, J. Mol. Biol. 55:
15 379 (1971)). Los aminoácidos de marco conservado ocasionalmente también pueden interaccionar con las CDR indirectamente, afectando a la conformación de otro aminoácido de marco conservado que a su vez contacta con las CDR.

Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en la región de marco conservado son capaces de interaccionar con las CDR en muchos anticuerpos (Chothia y Lesk, *supra*,
20 Chothia y col., *supra* y Tramontano y col., J. Mol. Biol. 215: 175 (1990)). Notablemente, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat) son capaces de interaccionar con las CDR en muchos anticuerpos. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también tienen probabilidad de interaccionar con las CDR. En todas
25 estas posiciones numeradas, se prefiere la elección del aminoácido donador en lugar del aminoácido aceptor (cuando difieren) para estar en la inmunoglobulina humanizada. Por otra parte, algunas veces pueden elegirse ciertos restos capaces de interaccionar con la región CDR, tales como los 5 primeros aminoácidos de la cadena ligera, de la inmunoglobulina aceptora sin perder afinidad en la inmunoglobulina humana.

30 Los restos que “participan en la interfaz VL-VH” o “restos de empaquetamiento” incluyen los restos en la interfaz entre VL y VH como se define, por ejemplo, por Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-66 (1985) o Chothia y col, *supra*. Generalmente, los restos de empaquetamiento no habituales deben retenerse en el anticuerpo humanizado si difieren de los de las regiones de marco conservado humanas.

35 En general, se sustituyen uno o más de los aminoácidos que cumplen los criterios

anteriores. En algunas realizaciones, se sustituyen todos o la mayoría de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores. Ocasionalmente, hay alguna ambigüedad sobre si un aminoácido particular cumple los criterios anteriores y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular y la otra no la tiene. Las
5 inmunoglobulinas variantes alternativas producidas de esta manera pueden ensayarse en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento con respecto a la actividad deseada, y seleccionarse la inmunoglobulina preferida.

Normalmente, las regiones CDR en los anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas y, más habitualmente, idénticas a las regiones CDR correspondientes del anticuerpo
10 donador. Aunque normalmente no es deseable, algunas veces es posible realizar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de restos de CDR sin afectar de forma apreciable a la afinidad de unión de la inmunoglobulina humanizada resultante. Por sustituciones conservativas se entienden combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos de marco conservado humanos aceptores que son poco habituales o “raros” para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donador de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Por ejemplo, puede ser deseable la sustitución cuando el aminoácido en una
15 región de marco conservado humana de la inmunoglobulina aceptora es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es común para esa posición en secuencias de inmunoglobulinas humanas; o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina aceptora es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora también es raro, con respecto a otras secuencias humanas. Este criterio ayuda a
20 asegurar que un aminoácido atípico en la región de marco conservado humana no altera la estructura del anticuerpo. Además, al reemplazar un aminoácido aceptor humano poco habitual con un aminoácido del anticuerpo donador que es típico para los anticuerpos humanos, el anticuerpo humanizado puede hacerse menos inmunogénico.

El término “raro”, como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en esa posición en menos de aproximadamente un 20%, pero normalmente menos de
30 aproximadamente un 10% de las secuencias en una muestra representativa de secuencias, y el término “común”, como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que aparece en más de aproximadamente un 25% pero normalmente más de aproximadamente un 50% de las secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de región
35 variable de cadena pesada y ligera humana se agrupan respectivamente en “subgrupos” de

secuencias que son especialmente homólogos entre sí y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat y col. *supra.*). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es “raro” o “común” entre secuencias humanas, con frecuencia será preferible considerar sólo las secuencias humanas en el mismo subgrupo que la

5

Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos de marco conservado humanos aceptores que se identificarían como parte de una región CDR bajo la definición alternativa propuesta por Chothia y col. *supra.* Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos de marco conservado humanos aceptores que se identificarían como parte de una región CDR según las definiciones de AbM y/o contacto. Notablemente, la CDR1 en la cadena pesada variable se define como que incluye los restos 26-32.

10

Otros candidatos para la sustitución son restos de marco conservado aceptores que corresponden a un resto de marco conservado donador raro o poco habitual. Los restos de marco conservado donadores raros o poco habituales son los que son raros o poco habituales (como se define en el presente documento) para los anticuerpos murinos en esa posición. Para los anticuerpos murinos, el subgrupo puede determinarse de acuerdo Kabat y pueden identificarse posiciones de restos que difieren de la consenso. Estas diferencias específicas de donante pueden indicar mutaciones somáticas en la secuencia murina que aumentan la actividad. Se retienen los restos poco habituales que se predice que afectan a la unión, mientras que pueden sustituirse los restos que se prevé que sean poco importantes para la unión.

15

20

Otros candidatos para la sustitución son restos que no son de línea germinal que aparecen en una región de marco conservado aceptora. Por ejemplo, cuando una cadena de anticuerpo aceptor (es decir, una cadena de anticuerpo humano que comparte una identidad de secuencia significativa con la cadena de anticuerpo donador) se alinea con una cadena de anticuerpo de línea germinal (que comparte de forma similar una identidad de secuencia significativa con la cadena donadora), los restos que no corresponden entre la región de marco conservado de la cadena aceptora y la región de marco conservado la cadena de la línea germinal pueden sustituirse por estos correspondientes de la secuencia de la línea germinal.

25

Aparte de las sustituciones de aminoácidos específicas analizadas anteriormente, las regiones de marco conservado de inmunoglobulinas humanizadas normalmente son sustancialmente idénticas y, más habitualmente, idénticas a las regiones de marco conservado de los anticuerpos humanos de los que proceden. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región de marco conservado hacen una contribución directa pequeña o nula a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. De esta manera, pueden tolerarse muchas

30

35

sustituciones conservativas individuales de restos de marco conservado sin un cambio apreciable de la especificidad o afinidad de la inmunoglobulina humanizada resultante. De esta manera, en una realización, la región de marco conservado variable de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos un 85% de identidad de secuencia con una región de marco conservado variable humana o consenso de dichas secuencias. En otra realización, la región de marco conservado variable de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 96%, un 97%, un 98% o un 99% de identidad de secuencia con una secuencia de región de marco conservado variable humana o consenso de dichas secuencias. En general, sin embargo, dichas sustituciones son indeseables.

Los anticuerpos humanizados preferentemente presentan una afinidad de unión específica por el antígeno de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M^{-1} . Normalmente, el límite superior de la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados por el antígeno está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco con respecto al de la inmunoglobulina donadora. Con frecuencia, el límite inferior de la afinidad de unión también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco con respecto al de la inmunoglobulina donadora. Como alternativa, la afinidad de unión puede compararse con la de un anticuerpo humanizado que no tiene sustituciones (por ejemplo, un anticuerpo que tiene CDR donadoras y FR aceptoras, pero no sustituciones de FR). En estos casos, la unión del anticuerpo optimizado (con sustituciones) preferentemente es al menos de dos a tres veces mayor, o de tres a cuatro veces mayor, que la del anticuerpo no sustituido. Para realizar comparaciones, puede determinarse la actividad de los diversos anticuerpos, por ejemplo, por BIACORE (es decir, resonancia de plasmón superficial usando reactivos no marcados) o ensayos de unión competitiva.

C. Producción de Anticuerpos 3D6 Humanizados

Una realización preferida de la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado contra el extremo N de A β , en particular, para uso en las metodologías terapéuticas y/o de diagnóstico descritas en el presente documento. Un material de partida particularmente preferido para la producción de anticuerpos humanizados es 3D6. 3D6 es específico para el extremo N de A β y se ha demostrado que media la fagocitosis (por ejemplo, induce la fagocitosis) de placas de amiloide (véanse los Ejemplos I-V). En el Ejemplo VI se describe la clonación y secuenciación de ADNc que codifica las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo 3D6.

Se identifican secuencias de anticuerpo aceptor humano adecuadas por comparaciones por ordenador de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se realiza de forma separada

para las cadenas pesada y ligera, pero los principios son similares para las dos. En particular, se identificaron dominios variables de anticuerpos humanos cuyas secuencias de marco conservado presentan un alto grado de identidad de secuencia con las regiones de marco conservado VL y VH murinas por consulta de la Base de Datos de Kabat usando NCBI BLAST (accesible para el público a través del servidor de internet del NCBI de los Institutos Nacionales de la Salud) con la secuencias de marco conservado murinas respectivas. En una realización, se seleccionan secuencias aceptoras que comparten más de un 50% de identidad de secuencia con secuencias donadoras murinas. Preferentemente, se seleccionan secuencias de anticuerpo aceptor que comparten un 60%, 70%, 80% o 90% o más.

Una comparación por ordenador de 3D6 reveló que la cadena ligera de 3D6 muestra la mayor identidad de secuencia con cadenas ligeras humanas de subtipo kappa II, y que la cadena pesada de 3D6 muestra mayor identidad de secuencia con cadenas pesadas humanas de subtipo III, como se define por Kabat y col. *supra*. De esta manera, las regiones de marco conservado humanas ligera y pesada proceden de anticuerpos humanos de estos subtipos, o de secuencias consenso de estos subtipos. Las regiones variables humanas de cadena ligera preferidas que muestran mayor identidad de secuencia con la región correspondiente de 3D6 proceden de anticuerpos que tienen Números de ID de Kabat 019230, 005131, 005058, 005057, 005059, U21040 y U41645, siendo más preferido 019230. Las regiones variables humanas de cadena pesada preferidas que muestran mayor identidad de secuencia con la región correspondiente de 3D6 proceden de anticuerpos que tienen los Números ID de Kabat 045919, 000459, 000553, 000386 y M23691, siendo más preferido 045919.

Después se seleccionan restos para la sustitución, como se indica a continuación. Cuando un aminoácido difiere entre una región de marco conservado variable de 3D6 y una región de marco conservado variable humana equivalente, el aminoácido de marco conservado humano normalmente debe sustituirse por el aminoácido de ratón equivalente si se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una de forma no covalente al antígeno directamente,
- (2) sea adyacente a una región CDR, sea parte de una región CDR bajo la definición alternativa propuesta por Chothia y col, *supra*, o interaccione de otra manera con una región CDR (por ejemplo, esté dentro de aproximadamente 3Å de una región CDR) (por ejemplo, los aminoácidos en las posiciones L2, H49 y H94 de 3D6), o
- (3) participe en la interfaz VL-VH (por ejemplo, aminoácidos en las posiciones L36, L46 y H93 de 3D6).

La obtención de modelos informáticos de las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo 3D6, y la humanización del anticuerpo 3D6 se describen en el Ejemplo

VII. En resumen, se generó un modelo tridimensional basándose en las estructuras de anticuerpo murino resueltas más próximas para las cadenas pesada y ligera. Para este fin, se eligió un anticuerpo denominado 1CR9 (Protein Data Bank (PDB) ID: 1CR9, Kanyo y col., J. Mol. Biol. 293: 855 (1999)) como molde para modelar la cadena ligera de 3D6, y se eligió un anticuerpo denominado 1OPG (PDB ID: 1OPG, Kodandapani y col., J. Biol. Chem. 270: 2268 (1995)) como molde para modelar la cadena pesada. El modelo se refinó adicionalmente por una serie de etapas de minimización de energía para liberar contactos atómicos desfavorables y optimizar las interacciones electrostáticas y de van der Waals. La estructura resulta de 1qkz (PDB ID: 1QKZ, Derrick y col., J. Mol. Biol. 293: 81 (1999)) se eligió como molde para modelar la CDR3 de la cadena pesada, ya que 3D6 y 1OPG no presentaban una homología de secuencia significativa en esta región cuando se alinearon con fines comparativos.

La información de la estructura tridimensional para los anticuerpos descritos en el presente documento está disponible para el público, por ejemplo, en Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank (PDB). Se puede acceder libremente al PDB por la Red Global Mundial Internet y se describe por Berman y col. (2000) Nucleic Acids Research, 28: 235. La creación de modelos informáticos permite la identificación de restos que interactúan con CDR. El modelado informático de la estructura de 3D6 a su vez puede servir como punto de partida para predecir la estructura tridimensional de un anticuerpo que contiene las regiones determinantes de complementariedad de 3D6 sustituidas en estructuras de marco conservado humanas. Pueden construirse otros modelos que representan la estructura cuando se introducen sustituciones de aminoácidos adicionales.

En general, es deseable la sustitución de uno, la mayoría o todos los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores. Por consiguiente, los anticuerpos humanizados de la presente invención normalmente contendrán una sustitución de un resto de marco conservado de cadena ligera humana con un resto de 3D6 correspondiente en al menos 1, 2 ó 3, y más habitualmente 4, de las siguientes posiciones: L1, L2, L36 y L46. Los anticuerpos humanizados normalmente también contienen una sustitución de un resto de marco conservado de cadena pesada humana con un resto de 3D6 correspondiente en al menos 1, 2 y algunas veces 3 de las siguientes posiciones: H49, H93 y H94. Los anticuerpos humanizados también pueden contener una sustitución de un resto de marco conservado de cadena pesada con un resto de línea germinal correspondiente en al menos 1, 2 y algunas veces 3 de las siguientes posiciones: H74, H77 y H89.

Sin embargo, ocasionalmente hay alguna ambigüedad sobre si un aminoácido particular cumple los criterios anteriores, y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular sin que la tenga la otra. En casos

en los que una sustitución con un resto murino introduciría un resto que es raro en inmunoglobulinas humanas en una posición particular, puede ser deseable ensayar la actividad del anticuerpo con o sin la sustitución particular. Si la actividad (por ejemplo, afinidad de unión y/o especificidad de unión) es aproximadamente igual con o sin la sustitución, puede preferirse el anticuerpo sin sustitución, ya que sería de esperar que indujera menos de una respuesta HAHA, como se describe en el presente documento.

Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos de marco conservado humanos aceptores que son poco habituales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas. Como alternativa, pueden introducirse aminoácidos de posiciones equivalentes en el 3D6 de ratón en las regiones de marco conservado humanas cuando dichos aminoácidos son típicos de inmunoglobulina humana en las posiciones equivalentes.

En realizaciones adicionales, cuando la inmunoglobulina aceptora de marco conservado de cadena ligera humana es el número de identificación de Kabat 019230, la cadena ligera contiene sustituciones en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o, más habitualmente, 13 de las siguientes posiciones: L7, L10, L12, L15, L17, L39, L45, L63, L78, L83, L85, L100 o L104. En realizaciones adicionales, cuando la inmunoglobulina aceptora de marco conservado de cadena pesada humana es número de identificación de Kabat 045919, la cadena pesada contiene sustituciones en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o, más habitualmente, 15, de las siguientes posiciones: H3, H5, H13, H16, H19, H40, H41, H42, H44, H72, H77, H82A, H83, H84 o H108. Estas posiciones se sustituyen con el aminoácido de la posición equivalente de una inmunoglobulina humana que tiene un resto de aminoácido más típico. En las Figuras 1 y 2 se muestran ejemplos de aminoácidos apropiados para la sustitución.

Otros candidatos para la sustitución son restos que no son de línea germinal que aparecen en una región de marco conservado. Una comparación por ordenador de 3D6 con secuencias de línea germinal conocidas reveló que las cadenas pesadas que muestran el mayor grado de identidad de secuencia incluyen secuencias de región variable de línea germinal VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 y VH3-11, siendo más preferida VH3-23. El alineamiento de Kabat ID 045919 con VH3-23 revela que los restos H74, H77 y/o H89 pueden seleccionarse para la sustitución con restos de línea germinal correspondientes (por ejemplo, restos H74, H77 y/o H89 cuando se comparan con Kabat ID 045919 y VH3-23). De forma similar, las secuencias de la línea germinal que tienen el mayor grado de identidad con la cadena ligera de 3D6 incluyen A1, A17, A18, A2 y A19, siendo el más preferido A19. Los

restos que no corresponden entre una región de marco conservado aceptora de cadena ligera seleccionada y una de estas secuencias de línea germinal podrían seleccionarse para la sustitución con el resto de línea germinal correspondiente.

La Tabla 1 resume el análisis de secuencia de las regiones VH y VL de 3D6. Se exponen estructuras de ratón y humanas adicionales que pueden usarse para la creación de modelos informáticos del anticuerpo 3D6 y anticuerpos humanos adicionales, así como secuencias de línea germinal que pueden usarse en la selección de sustituciones de aminoácidos. También se exponen en la Tabla 1 restos de ratón raros. Los restos de ratón raros se identifican comparando las secuencias de VL y/o VH donadoras con las secuencias de otros miembros del subgrupo al que pertenecen las secuencias de VL y/o VH donadoras (de acuerdo con Kabat) y que identifican las posiciones de restos que difieren del consenso. Estas diferencias específicas de donador pueden señalar mutaciones somáticas que aumentan la actividad. Posiblemente, pueden entrar en contacto restos poco habituales o raros próximos al sitio de unión con el antígeno, lo que hace que sea deseable retener el resto de ratón. Sin embargo, si el resto de ratón poco habitual no es importante para la unión, se prefiere el uso del resto aceptor correspondiente, ya que el resto de ratón puede crear neoepítopes inmunogénicos en el anticuerpo humanizado. En la situación en la que un resto poco habitual en la secuencia del donador realmente es un resto común en la secuencia del aceptor correspondiente, el resto preferido es claramente el resto del aceptor.

Tabla 1: Resumen de secuencia de la región V de 3D6

Cadena	Pesada	Ligera
Subgrupo de ratón (Kabat, sec ID N°)	IIID (002688)	II (005840-005844, 005851-005853, 005857,005863)
Homólogos de ratón (Kabat/Genbank)	002727/163.1'CL 002711/H35-C6'CL 002733/8-1-12-5-3-1(A2-1)'CL 002715/ASWA2'CL 020669/#14'CL	005840/1210.7 005843/42.4b.12.2'CL 005842/BXW-14'CL 005841/42.7B3.2'CL 005851/36-60CRI-
Aminoácidos raros (% de frecuencia de aparición en clase)	N40 (0,233%) D42 (0,699%)	Y1 (0,035%) I15 (3,3%) D27 (0,867%)-CDR1 I78 (0,677%) L85 (0,625%) W89 (0,815%)-CDR3 K106A (0,295%)

Subgrupo humano	III (000488-000491, 000503, 000624)	II (005046)
Agrupamientos de CDR canónicos de Chothia [ejemplo pdb]	H1: clase 1 [2fbj] H2: clase 3 [ligc]	L1: clase 4 [1rmf] L2: clase 1 [1lmk] L3: clase 1 [1tet]
Estructuras de ratón resueltas más próximas	PDB ID: 1OPG Kodandapani y col., <i>supra</i> ; (72% 2Å)	PDB ID: 1CR9; Kanyo y col., <i>supra</i> ; (94%, 2Å) PDB ID: 1NLD; Davies y col., <i>Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallog.</i> 53:186 (1997); (98%, 2,8Å)
Estructuras humanas resueltas más próximas	1VH (68%, rmn) 443560 (65%, IgG, mieloma λ, 1,8Å) KOL/2FB4H (60%, mieloma, 3Å)	1LVE (57%, LEN) 1B6DA (54%, dímero B-J, 2,8Å); 1VGEL (54%, autoAb)
Resultados de la consulta (Hu) de línea germinal (superior 4)	VH3-48 (4512283/BAA75032.1) VH3-23 (4512287/BAA75046.1) VH3-7 (4512300/BAA75056.1) VH3-21 (4512287/BAA75047.1) VH3-11 (4152300/BAA75053.1)	A1(x63402) A17 (x63403) A18 (X63396) A2 (m31952) A19 (x63397)
*Cadena pesada y cadena ligera del mismo anticuerpo (O-81, Hirabayashi y col. NAR 20:2601)		

Las secuencias ID de Kabat mencionadas en el presente documento están disponibles para el público, por ejemplo, en Northwestern University Biomedical Engineering Department's Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest. La información de la estructura tridimensional para anticuerpos descritos en el presente documento está disponible para el público, por ejemplo, en Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank (PDB). Se puede acceder libremente al PDB a través de la Red Global Mundial Internet y se describe por Berman y col. (2000) *Nucleic Acids Research*, p235-242. Las secuencias génicas genuinas mencionadas en el presente documento están disponibles para el público, por ejemplo, en la base de datos de secuencias del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) en colecciones de genes de línea germinal V de Igh, Ig kappa e Ig lambda (como una división de la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) en los Institutos Nacionales de la Salud (NIH). La búsqueda de homología de la base de datos de "Genes de Línea Germinal de Ig" del NCBI se proporciona por IgG BLAST™.

En una realización preferida, un anticuerpo humanizado de la presente invención contiene (i) una cadena ligera que comprende un dominio variable que comprende CDR de VL de 3D6 murino y una región de marco conservado aceptora humana, teniendo la región de

marco conservado al menos uno, preferentemente dos, tres o cuatro restos seleccionados del grupo constituido por L1, L2, L36 y L46 sustituidos con el resto de 3D6 correspondiente y (ii) una cadena pesada que comprende CDR de VH de 3D6 y una región de marco conservado aceptora humana, teniendo la región de marco conservado al menos uno, preferentemente dos o tres restos seleccionados del grupo constituido por H49, H93 y H94 sustituidos con el resto de 3D6 correspondiente y, opcionalmente, al menos uno, preferentemente dos o tres restos seleccionados del grupo constituido por H74, H77 y H89 están sustituidos con un resto de línea germinal humana correspondiente.

En una realización más preferida, un anticuerpo humanizado de la presente invención contiene (i) una cadena ligera que comprende un dominio variable que comprende CDR de VL de 3D6 murino y una región de marco conservado aceptora humana, teniendo la región de marco conservado el resto 1 sustituido con una tyr (Y), el resto 2 sustituido con una val (V), el resto 36 sustituido con una leu (L) y/o el resto 46 sustituido con una arg (R), y (ii) una cadena pesada que comprende CDR de VH de 3D6 y una región de marco conservado aceptora humana, teniendo la región de marco conservado el resto 49 sustituido con una ala (A), el resto 93 sustituido con una val (V) y/o el resto 94 sustituido con una arg (R) y, opcionalmente, teniendo el resto 74 sustituido con una ser (S), el resto 77 sustituido con una thr (T) y/o el resto 89 sustituido con una val (V).

En una realización particularmente preferida, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describe en el presente documento, y además tiene al menos una (preferentemente dos, tres, cuatro o todas) las siguientes actividades: (1) se une a A β 1-42 agregado (por ejemplo, como se determina por ELISA); (2) se une a A β en placas (por ejemplo, tinción de placas AD y/o PDAPP); (3) se une a A β con una afinidad de unión de dos a tres veces mayor en comparación con 3D6 quimérico (por ejemplo, 3D6 que tiene secuencias de región variable murina y secuencias de región constante humana); (4) media la fagocitosis de A β (por ejemplo, en un ensayo de fagocitosis *ex vivo* como se describe en el presente documento); y (5) atraviesa la barrera hematoencefálica (por ejemplo, demuestra localización cerebral a corto plazo, por ejemplo, en un modelo animal de PDAPP, como se describe en el presente documento).

En otra realización, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describe en el presente documento, y se une a A β de una manera o con una afinidad suficiente para inducir al menos uno de los siguientes efectos *in vivo*: (1) reducir la carga de placas de A β ; (2) prevenir la formación de placas; (3) reducir los niveles de A β soluble; (4) reducir la patología neurítica asociada con un trastorno amiloidogénico; (5) reducir o mejorar al menos un síntoma fisiológico asociado con un trastorno

amiloidogénico; y/o (6) mejorar la función cognitiva.

En otra realización, un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene características estructurales, como se describe en el presente documento, y se une específicamente a un epítoto que comprende los restos 1-5 ó 3-7 de A β .

5 Las actividades descritas anteriormente pueden determinarse utilizando uno cualquiera de una diversidad de ensayos descritos en el presente documento o en la técnica (por ejemplo, ensayos de unión, ensayos de fagocitosis, etc.). Las actividades pueden ensayarse *in vivo* (por ejemplo, usando componentes de ensayo marcados y/o técnicas de formación de imágenes) o *in vitro* (por ejemplo, usando muestras o especímenes derivados de un sujeto). Las actividades
10 pueden ensayarse directa o indirectamente. En ciertas realizaciones preferidas, se ensayan variables de valoración neurológicas (por ejemplo, carga amiloide, carga neurítica, etc.). Estas variables de valoración pueden ensayarse en seres vivos (por ejemplo, en modelos animales de enfermedad de Alzheimer o en sujetos humanos, por ejemplo, sometidos a inmunoterapia) usando metodologías de detección no invasivas. Como alternativa, estas variables de
15 valoración pueden ensayarse en sujetos post mórtem. El ensayo de dichas variables de valoración en modelos animales y/o en sujetos humanos post mórtem es útil para evaluar la eficacia de diversos agentes (por ejemplo, anticuerpos humanizados) a utilizar en aplicaciones inmunoterapéuticas similares. En otras realizaciones preferidas, pueden evaluarse parámetros de comportamiento o neurológicos como indicadores de las actividades o variables de
20 valoración neuropatológicas anteriores.

2. Producción de Regiones Variables

Habiendo seleccionado conceptualmente los componentes de CDR y de marco conservado de las inmunoglobulinas humanizadas, se dispone de una diversidad de procedimientos para producir dichas inmunoglobulinas. Debido a la degeneración del código,
25 una diversidad de secuencias de ácido nucleico codificarán cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina. Las secuencias de ácido nucleico deseadas pueden producirse por síntesis de ADN en fase sólida de *nov*o o por mutagénesis por PCR de una variante preparada previamente del polinucleótido deseado. La mutagénesis mediada por oligonucleótido es un procedimiento preferido para preparar variantes de sustitución, delección e inserción del ADN
30 del polipéptido diana. Véase Adelman y col., ADN 2:183 (1983). En resumen, el ADN del polipéptido diana se altera por hibridación de un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con un molde de ADN monocatenario. Después de la hibridación, se usa la ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria entera del molde que incorpora el cebador oligonucleotídico, y codifica la alteración seleccionada en el ADN del
35 polipéptido diana.

3. Selección de Regiones Constantes

Los segmentos variables de anticuerpos producidos como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos) típicamente se asocian al menos a una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Pueden aislarse secuencias de ADN de región constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una diversidad de células humanas, pero preferentemente células B inmortalizadas (véase Kabat y col., *supra*, y Liu y col., documento W087/02671). Normalmente, el anticuerpo contendrá regiones constantes tanto de cadena ligera como de cadena pesada. La región constante de cadena pesada normalmente incluye regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4. Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea toxicidad mediada por células y/o del complemento dependiente de anticuerpos. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad del complemento y los isotipos IgG2 e IgG4 no. Cuando se desea que el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo humanizado) presente actividad citotóxica, el dominio constante normalmente es un dominio constante de fijación de complemento y la clase típicamente es IgG1. Cuando no es deseable dicha actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de clase IgG2. La elección del isotipo también puede afectar al pase del anticuerpo al cerebro. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab' F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos monocatenarios en los que dominios variables de cadena pesada y cadena ligera se unen a través de un espaciador.

4. Expresión de Anticuerpos Recombinantes

Típicamente se producen anticuerpos quiméricos humanizados y humanos por expresión recombinante. Se insertan ácidos nucleicos que codifican regiones variables de cadena ligera y pesada, opcionalmente unidos a regiones constantes, en vectores de expresión. Las cadenas ligera y pesada pueden clonarse en el mismo o en diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina se unen operativamente a secuencias de control en el vector o vectores de expresión que aseguran la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina. Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero sin limitación, promotores (por ejemplo, promotores heterólogos o asociados de

forma natural), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos, y la colección y purificación de los anticuerpos que presentan reacción cruzada.

Estos vectores de expresión típicamente son replicables en los organismos huésped como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de las linfocitos Transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Itakura y col., Patente de Estados Unidos 4.704.362).

E. coli es un huésped procariota particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariotas, también se pueden realizar vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitio de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Otros microbios, tales como levaduras, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, teniendo los vectores adecuados secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, cuando se desee. Los promotores típicos incluyen la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de la alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Además de microorganismos, también pueden usarse cultivos de células de tejidos de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de la misma). Véase Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Realmente se prefieren células

eucariotas, porque se han desarrollado en la técnica varias líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas) e incluyen líneas de células CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, preferentemente líneas de células de mieloma, o células B transformadas o hibridomas.

5 Preferentemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen y col., Immunol. Rev. 89:49 (1986)) y sitios de información de procesamiento necesarios tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Son
10 secuencias de control de la expresión preferidas promotores procedentes de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co y col., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Como alternativa, pueden incorporarse secuencias codificantes de anticuerpos en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la expresión posterior
15 en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer y col., documento US 5.741.957, Rosen, documento US 5.304.489, y Meade y col., US 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes de cadenas ligera y/o pesada en asociación operativa con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

20 Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera y secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, comúnmente se utiliza la transfección con cloruro cálcico para células procariotas, mientras que puede usarse el tratamiento con
25 fosfato cálcico, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus para otros huéspedes celulares. (Véase, en general, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989). Otros procedimientos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase, en general, Sambrook y col., *supra*). Para
30 la producción de animales transgénicos, pueden microinyectarse transgenes en oocitos fertilizados o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células pueden transferirse a oocitos enucleados.

Cuando se clonan cadenas pesadas y ligeras en vectores de expresión separados, los vectores se co-transfectan para obtener la expresión y ensamblaje de inmunoglobulinas
35 intactas. Una vez expresados, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas ligera y pesada

individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad al menos de aproximadamente el 90 al 95%, siendo más preferida una homogeneidad del 98 al 99% o mayor, para usos farmacéuticos.

5. Ensayo de Anticuerpos con Respecto a la Eficacia Terapéutica en Modelos Animales

En grupos de ratones PDAPP de 7-9 meses de edad, se inyectan 0,5 mg en PBS de anticuerpos policlonales anti-A β o anticuerpos monoclonales anti-A β específicos. Todas las preparaciones de anticuerpos se purifican para tener bajos niveles de endotoxina. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales contra un fragmento por inyección del fragmento o una forma de mayor tamaño de A β en un ratón, preparación de hibridomas y exploración de los hibridomas con respecto a un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento deseado de A β sin unirse a otros fragmentos no solapantes de A β .

Los ratones se someten a inyecciones intraperitoneales cuando es necesario, durante un período de 4 meses, para mantener una concentración de anticuerpo circulante medida por el título de ELISA mayor de 1/1000 definido por ELISA contra A β 42 u otro inmunógeno. Se observan los títulos y los ratones se sacrifican al final de 6 meses de inyecciones. Se determina la histoquímica, los niveles de A β y la toxicología post mórtem. Se usan diez ratones por grupo.

6. Selección de Anticuerpos con Respecto a la Actividad de Eliminación

La invención también proporciona procedimientos para explorar un anticuerpo con respecto a la actividad en la eliminación de un depósito de amiloide o cualquier otro antígeno, o entidad biológica asociada, para la que se desea la actividad de eliminación. Para explorar la actividad contra un depósito de amiloide, se pone en contacto una muestra de tejido de un cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer o un modelo animal que tiene una patología característica de Alzheimer con células fagocíticas que llevan un receptor de Fc, tales como células de microglía, y el anticuerpo bajo ensayo en un medio *in vitro*. Las células fagocíticas pueden ser un cultivo primario o una línea celular, tal como BV-2, C8-B4 o THP-1. En algunos procedimientos, los componentes se combinan en un portaobjetos de microscopio para facilitar la observación microscópica. En algunos procedimientos, se realizan múltiples reacciones en paralelo en los pocillos de una placa de microtitulación. En dicho formato, puede montarse un portaobjetos de microscopio en miniatura separado en los pocillos separados, o puede usarse un formato de detección no microscópico, tal como detección ELISA de A β .

Preferentemente, se realiza una serie de mediciones de la cantidad de depósito de amiloide en la mezcla de reacción *in vitro*, empezando a partir de un valor basal antes de que haya procedido la reacción, y uno o más valores de ensayo durante la reacción. El antígeno puede detectarse por tinción, por ejemplo, con un anticuerpo marcado con fluorescencia contra A β u otro componente de las placas de amiloide. El anticuerpo usado para la tinción puede ser o no igual que el anticuerpo que se ensaya con respecto a la actividad de eliminación. Una reducción con respecto al valor basal durante la reacción de los depósitos de amiloide indica que el anticuerpo bajo ensayo tiene actividad de eliminación. Estos anticuerpos probablemente serán útiles en la prevención o tratamiento de la enfermedad del Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas.

Pueden usarse procedimientos análogos para explorar anticuerpos con respecto a la actividad de eliminación de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo puede usarse para detectar la actividad de eliminación contra prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. Típicamente, la entidad biológica tiene el mismo papel en enfermedades humanas o animales. La entidad biológica puede proporcionarse como una muestra de tejido o en forma aislada. Si se proporciona como una muestra de tejido, la muestra de tejido preferentemente no se fija para permitir un acceso fácil a componentes de la muestra de tejido y para evitar la alteración de la conformación de los componentes secundarios a la fijación. Los ejemplos de muestras de tejidos que pueden ensayarse en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejido que contiene crecimientos benignos tales como verrugas o lunares, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejido infiltrado con células inflamatorias, tejido que lleva matrices patológicas entre células (por ejemplo, pericarditis fibrinosa), tejido que lleva antígenos aberrantes y tejido de cicatrización. Los ejemplos de entidades biológicas aisladas que pueden usarse incluyen A β , antígenos virales o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos tumorales y moléculas de adhesión. Estos antígenos pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, expresión recombinante o síntesis química, entre otros medios. La muestra de tejido o entidad biológica aislada se pone en contacto con células fagocíticas que llevan receptores de Fc, tales como monocitos o células de microglía, y un anticuerpo a ensayar en un medio. El anticuerpo puede estar dirigido a la entidad biológica bajo ensayo o a un antígeno asociado con la entidad. En la última situación, el objetivo es ensayar si la entidad biológica se fagocita indirectamente con el antígeno. Normalmente, aunque no es necesario, el anticuerpo y la entidad biológica (algunas veces con un antígeno asociado) se ponen en contacto entre sí antes de añadir las células fagocíticas. Después se observa la concentración de la entidad biológica y/o el antígeno asociado que queda en el medio, si está presente. Una reducción en la cantidad o concentración de antígeno o la entidad

biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de eliminación contra el antígeno y/o entidad biológica asociada junto con las células fagocíticas (véase, por ejemplo, el Ejemplo V).

7. Anticuerpos Quiméricos / Humanizados que Tienen una Función Efectora Alterada

5 Los anticuerpos descritos anteriormente de la invención comprenden una región constante (región Fc) que tiene una función efectora alterada de la molécula. En general, la función efectora de un anticuerpo reside en la región constante o Fc de la molécula que puede mediar la unión a diversas moléculas efectoras, por ejemplo, proteínas del complemento o receptores de Fc. La unión del complemento a la región Fc es importante, por ejemplo, en la opsonización y lisis de patógenos celulares y la activación de respuestas inflamatorias. La unión del anticuerpo a receptores de Fc, por ejemplo, en la superficie de células efectoras puede inducir varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen, por ejemplo, englobamiento y destrucción de patógenos o partículas revestidas de anticuerpos, eliminación de complejos inmunes, lisis de células diana revestidas de anticuerpo por células destructoras (es decir, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria de anticuerpos y control de la producción de inmunoglobulinas.

15 Por consiguiente, dependiendo de una aplicación terapéutica o de diagnóstico particular, pueden ser deseables las funciones inmunes mencionadas anteriormente, o sólo funciones inmunes seleccionadas. Mediante la alteración de la región Fc del anticuerpo, se consiguen diversos aspectos de la función efectora de la molécula, incluyendo aumento o supresión de diversas reacciones del sistema inmune, con efectos beneficiosos en el diagnóstico y terapia.

20 Los anticuerpos de la invención pueden producirse de forma que sólo reaccionen con ciertos tipos de receptores de Fc, por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden modificarse para unirse sólo a ciertos receptores de Fc, o si se desea, carecer totalmente de unión al receptor de Fc, por delección o alteración del sitio de unión al receptor de Fc localizado en la región Fc del anticuerpo. Otras alteraciones deseables de la región Fc de un anticuerpo de la invención se catalogan más adelante. Típicamente, se usa el sistema de numeración de Kabat para indicar los restos de aminoácidos de la región Fc (por ejemplo, de un anticuerpo IgG) que se alteran (por ejemplo, por sustitución de aminoácidos) para conseguir un cambio deseado en la función efectora. También se emplea el sistema de numeración para comparar anticuerpos entre especies de tal forma que una función efectora deseada observada, por ejemplo, en un anticuerpo de ratón, pueda conseguirse sistemáticamente por ingeniería genética en un anticuerpo humano, "humanizado" o quimérico de la invención.

35 Por ejemplo, se ha observado que los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos IgG) pueden

agruparse en los que se ha descubierto que presentan una unión fuerte, intermedia o débil con un receptor de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc en monocitos humanos (Fc γ RI)). Por comparación de las secuencias de aminoácidos en estos grupos de diferente afinidad, se ha identificado un sitio de unión a monocitos en la región de unión a la bisagra (Leu234-Ser239).

5 Además, el receptor Fc γ RI humano se une a la IgG1 humana y a la IgG2a de ratón como un monómero, pero la unión a la IgG2b de ratón es cien veces más débil. Una comparación de la secuencia de estas proteínas en la región de unión a la bisagra muestra que la secuencia 234 a 238, es decir, Leu-Leu-Gly-Gly-Pro en los que se unen fuertemente se convierte en Leu-Glu-Gly-Gly-Pro en 2b gamma de ratón, es decir, en los que se unen débilmente. Por consiguiente,
10 puede realizarse un cambio correspondiente en la secuencia de bisagra de anticuerpo humano si se desea una menor unión al receptor Fc γ I. Se entiende que pueden realizarse otras alteraciones para conseguir el mismo resultado o resultados similares. Por ejemplo, la afinidad de unión de Fc γ RI puede alterarse reemplazando el resto especificado con un resto que tiene un grupo funcional inapropiado en su cadena lateral, o introduciendo un grupo funcional
15 cargado (por ejemplo, Glu o Asp) o, por ejemplo, un resto no polar aromático (por ejemplo, Phe, Tyr o Trp).

Estos cambios pueden aplicarse igualmente a los sistemas murino, humano y de rata dada la homología de secuencia entre las diferentes inmunoglobulinas. Se ha demostrado que para la IgG3 humana, que se une al receptor Fc γ RI humano, el cambio de Leu 235 por Glu
20 destruye la interacción del mutante con el receptor. El sitio de unión para este receptor de esta forma puede cambiarse o inactivarse realizando la mutación apropiada.

Mutaciones en sitios adyacentes o próximos a la región de unión a la bisagra (por ejemplo, el reemplazo de los restos 234, 236 o 237 por Ala) indican que alteraciones en los restos 234, 235, 236 y 237 al menos afectan a la afinidad por el receptor Fc γ RI. Por
25 consiguiente, los anticuerpos de la invención tienen una región Fc alterada con una afinidad de unión alterada por Fc γ RI en comparación con el anticuerpo no modificado. Dicho anticuerpo convenientemente tiene una modificación en el resto de aminoácido 234, 235, 236 ó 237.

La afinidad por otros receptores de Fc puede alterarse por una estrategia similar, controlando la respuesta inmune de diferentes formas.

30 Como ejemplo adicional, pueden alterarse las propiedades líticas de anticuerpos IgG después de la unión al componente C1 del complemento.

El primer componente del sistema del complemento, C1, comprende tres proteínas conocidas como Clq, Ck y CIs que se unen fuertemente entre sí. Se ha demostrado que Clq es responsable de la unión del complejo de tres proteínas a un anticuerpo.

35 Por consiguiente, la actividad de unión a Clq de un anticuerpo puede alterarse

proporcionando un anticuerpo con un dominio CH2 alterado en el que al menos uno de los restos de aminoácidos 318, 320 y 322 de la cadena pesada se ha cambiado por un resto que tienen una cadena lateral diferente. La numeración de los restos en la cadena pesada es la del índice EU (véase Kabat y col., supra). Otra alteración adecuada para alterar, por ejemplo, reducir o anular la unión de Clq específica a un anticuerpo, incluye el cambio de uno cualquiera de los restos 318 (Glu), 320 (Lys) y 322 (Lys), a Ala.

Además, al realizar mutaciones en estos restos, se ha demostrado que la unión a Clq se retiene siempre que el resto 318 tenga una cadena lateral de unión a hidrógeno y los restos 320 y 322 tengan una cadena lateral cargada positivamente.

La actividad de unión a Clq puede anularse reemplazando uno cualquiera de los tres restos especificados con un resto que tiene una funcionalidad inapropiada en su cadena lateral. No es necesario reemplazar los restos iónicos sólo con Ala para anular la unión a Clq. También es posible usar otros restos no iónicos sustituidos con alquilo tales como Gly, Ile, Leu o Val, o restos aromáticos no polares tales como Phe, Tyr, Trp y Pro en lugar de uno cualquiera de los tres restos para anular la unión a Clq. Además, también es posible usar restos no iónicos polares tales como Ser, Thr, Cys y Met en lugar de los restos 320 y 322, pero no 318, para anular la actividad de unión a Clq.

También se indica que las cadenas laterales o los restos polares no iónicos o iónicos podrán formar enlaces de hidrógeno de una forma similar a los enlaces formados por el resto de Glu. Por lo tanto, el reemplazo del resto 318 (Glu) por un resto polar puede modificar pero no anular la actividad de unión a Clq.

También se sabe que el reemplazo del resto 297 (Asn) con Ala tiene como resultado la eliminación de la actividad lítica mientras que sólo reduce ligeramente (aproximadamente 3 veces) la afinidad por Clq. Esta alteración destruye el sitio de glicosilación en presencia de carbohidrato que se requiere para la activación del complemento. Cualquier otra sustitución en este sitio también destruirá el sitio de glicosilación.

La invención también proporciona un anticuerpo que tiene una función efectora alterada en el que el anticuerpo tiene una región de bisagra modificada. La región de bisagra modificada puede comprender una región de bisagra completa procedente de un anticuerpo de una clase o subclase de anticuerpo diferente de la del dominio CH1. Por ejemplo, el dominio constante (CH1) de un anticuerpo de clase IgG puede unirse a una región de bisagra de un anticuerpo de clase IgG4. Como alternativa, la nueva región de bisagra puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad de repetición en la que cada unidad de la repetición procede de una región de bisagra natural. En un ejemplo, la región de bisagra natural se altera convirtiendo uno o más restos de cisteína en un resto neutro, tal como alanina, o por

conversión de restos colocados de forma adecuada en restos de cisteína. Dichas alteraciones se realizan usando la química de proteínas reconocida en la técnica y, preferentemente, técnicas de ingeniería genética como se describe en el presente documento.

5 En una realización de la invención, el número de restos de cisteína en la región de bisagra del anticuerpo se reduce, por ejemplo, a un resto de cisteína. Esta modificación tiene la ventaja de facilitar el ensamblaje del anticuerpo, por ejemplo, moléculas de anticuerpo
bienespecíficas y moléculas de anticuerpo en las que la parte Fc se ha remplazado por una
molécula efectora o indicadora, ya que sólo es necesario formar un solo enlace disulfuro. Esta
modificación también proporciona una diana específica para la unión de la región de bisagra a
10 otra región de bisagra o a una molécula efectora o indicadora, directa o indirectamente, por
medios químicos.

Por el contrario, el número de restos de cisteína en la región de bisagra del anticuerpo
aumenta, por ejemplo, al menos uno más que el número de restos de cisteína que aparecen
normalmente. El aumento del número de restos de cisteína puede usarse para estabilizar las
15 interacciones entre bisagras adyacentes. Otra ventaja de esta modificación es que facilita el
uso de grupos tiol de cisteína para unir moléculas efectoras o indicadoras al anticuerpo
alterado, por ejemplo, un radiomarcador.

Por consiguiente, la invención proporciona un intercambio de regiones de bisagra entre
clases de anticuerpo, en particular, clases de IgG, y/o un aumento o reducción en el número de
20 restos de cisteína en la región de bisagra para conseguir una función efectora alterada (véase,
por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.677.425. Se realiza una determinación de la
función efectora de anticuerpo alterada usando los ensayos descritos en el presente
documento u otras técnicas reconocidas en este campo.

De forma importante, el anticuerpo resultante puede someterse a uno o más ensayos
25 para evaluar cualquier cambio en la actividad biológica en comparación con el anticuerpo de
partida. Por ejemplo, la capacidad del anticuerpo con una región Fc alterada de unirse al
complemento o a los receptores de Fc puede evaluarse usando los ensayos descritos en el
presente documento así como cualquier ensayo reconocido en la técnica.

La producción de los anticuerpos de la invención se realiza por cualquier técnica
30 adecuada incluyendo técnicas descritas en el presente documento así como técnicas
conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede sintetizarse una secuencia de
proteína apropiada, por ejemplo, que forma parte de o constituye todo el dominio constante
relevante, por ejemplo, una región Fc, es decir, dominios CH2 y/o CH3 de un anticuerpo, e
incluye restos alterados de forma apropiada, y después unirse químicamente en el sitio
35 apropiado en una molécula de anticuerpo.

Preferentemente, se usan técnicas de ingeniería genética para producir un anticuerpo alterado. Las técnicas preferidas incluyen, por ejemplo, la preparación de cebadores apropiados para uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tal forma que se altere una secuencia de ADN que codifica al menos parte de una cadena pesada de IgG, por ejemplo, una región constante o Fc (por ejemplo, CH2 y/o CH3), en uno o más restos. El segmento después puede unirse operativamente a la porción restante del anticuerpo, por ejemplo, la región variable del anticuerpo y elementos reguladores necesarios para la expresión en una célula.

La presente invención también incluye vectores usados para transformar la línea celular, vectores usados para producir los vectores de transformación, líneas celulares transformadas con los vectores de transformación, líneas celulares transformadas con vectores preparativos y procedimientos para su producción.

Preferentemente, la línea celular que se transforma para producir el anticuerpo con una región Fc alterada (es decir, de función efectora alterada) es una línea celular de mamífero inmortalizada (por ejemplo, una célula CHO).

Aunque la línea celular usada para producir el anticuerpo con una región Fc alterada preferentemente es una línea celular de mamífero, como alternativa puede usarse cualquier otra línea celular adecuada, tal como una línea celular bacteriana o una línea celular de levadura.

B. Ácido Nucleico que Codifica Agentes Inmunológicos y Terapéuticos

También pueden inducirse respuestas inmunes contra depósitos amiloides mediante la administración de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y sus cadenas componentes usados para inmunización pasiva. Estos ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno típicamente se une a elementos reguladores, tales como un promotor y un potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana deseadas de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, son adecuados para dirigir la expresión elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada o el potenciador y el promotor temprano intermedio principal de CMV. Los elementos reguladores asociados y las secuencias codificantes con frecuencia se clonan en un vector. Para la administración de anticuerpos bicatenarios, las dos cadenas pueden clonarse en el mismo vector o en vectores separados.

Se dispone de varios sistemas de vectores virales incluyendo sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109 (1993)); vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett y col., J. Virol. 67:5911 (1993)); vectores de virus

adenoasociados (véase, por ejemplo, Zhou y col., J. Exp. Med. 179:1867 (1994)), vectores virales de la familia de los poxvirus incluyendo virus vaccinia y el virus de la viruela aviar, vectores virales de géneros de virus alfa tales como los procedentes de los virus Sindbis y Semliki Forest (véase, por ejemplo, Dubensky y col., J. Virol. 70:508 (1996)), el virus de la encefalitis equina venezolana (véase Johnston y col., documento US 5.643.576) y rabdovirus, tales como el virus de la estomatitis vesicular (véase Rose, documento WO 96/34625) y papilomavirus (Ohe y col., Human Gene Therapy 6:325 (1995); Woo y col., documento WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que lo contiene, puede empaquetarse en liposomas. Se describen lípidos adecuados y análogos relacionados por Eppstein y col., documento US 5.208.036, Felgner y col., documento US 5.264.618, Rose, documento US 5.279.833, y Eppand y col., documento US 5.283.185. También pueden adsorberse vectores y ADN que codifica un inmunógeno o asociarse con vehículos en forma de partículas, cuyos ejemplos incluyen polímeros de polimetil metacrilato y polilactidas y poli(lactida-co-glicolidas), véase, por ejemplo McGee y col., J. Micro Encap. (1996).

Pueden administrarse vectores de terapia génica o polipéptidos desnudos (por ejemplo, ADN) *in vivo* mediante la administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica (véase, por ejemplo, Anderson y col., documento US 5.399.346). La expresión "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos algunas veces se clonan en un vector plasmídico. Estos vectores pueden incluir además agentes de facilitación tales como bupivacina (Attardo y col., documento US 5.593.970). También puede administrarse ADN usando una pistola génica. Véase Xiao & Brandsma, *supra*.

El ADN que codifica un inmunógeno se precipita en la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda expansiva o gas helio en expansión y penetran en los tejidos a una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, es adecuado el Accel™ Gene Delivery Device fabricado por Agacetus, Inc. Middleton WI. Como alternativa, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel a la corriente sanguínea simplemente salpicando el ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (véase Howell y col., documento WO 95/05853).

En una variación adicional, pueden administrarse vectores que codifican inmunógenos a células *ex vivo*, tales como células explantadas a partir de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsias de tejidos) o células madre hematopoyéticas de donador universal, seguido de reimplantación de las células en un

paciente, normalmente después de la selección de células que han incorporado el vector.

II. Usos Profilácticos y Terapéuticos

La presente invención se refiere, entre otras cosas, al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloidogénicas mediante la administración de reactivos inmunológicos terapéuticos (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas) a epítopes específicos dentro de A β a un paciente en condiciones que generen una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente (por ejemplo, inducción de fagocitosis de A β , reducción de la carga de placas, inhibición de la formación de placas, reducción de la distrofia neurítica, mejora de la función cognitiva y/o inversión, tratamiento o prevención del deterioro cognitivo) en el paciente, por ejemplo, para la prevención o tratamiento de una enfermedad amiloidogénica. La invención también se refiere al uso de los reactivos inmunológicos desvelados (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad amiloidogénica.

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislada de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a una enfermedad, con el objetivo de curar, sanar, aliviar, disipar, alterar, remediar, mejorar, mitigar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad asociada con depósitos amiloides de A β en el cerebro de un paciente. Estas enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Down y deterioro cognitivo. Este último puede producirse con o sin otras características de enfermedad amiloidogénica. Algunos procedimientos de la invención implican la administración al paciente de una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un componente de un depósito amiloide. Estos usos son particularmente útiles para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos. Los procedimientos ilustrativos implican la administración de una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une a A β . Los usos preferidos implican la administración de una dosificación eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-10 de A β , por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-3 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-4 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-5 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-6 de A β , anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-7 de A β o anticuerpos que se unen

específicamente a un epítipo dentro de los restos 3-7 de A β . En otro aspecto, la invención se refiere a la administración de anticuerpos que se unen a un epítipo que comprende un resto N-terminal libre de A β . En otro aspecto, la invención se refiere a la administración de anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de los restos 1-10 de A β en el que el resto 1 y/o resto 7 de A β es ácido aspártico. En otro aspecto, la invención se refiere a la administración de anticuerpos que se unen específicamente al péptido A β sin unirse a la proteína precursora amiloide (APP) de longitud completa. En otro aspecto, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana.

En otro aspecto, la invención se refiere a la administración de anticuerpos que se unen a un depósito de amiloide en el paciente e inducen una respuesta de eliminación contra el depósito de amiloide. Por ejemplo, dicha respuesta de eliminación puede realizarse por fagocitosis mediada por el receptor de Fc.

Los agentes terapéuticos de la invención típicamente son sustancialmente puros y están libres de contaminantes indeseados. Esto significa que un agente tiene una pureza de al menos aproximadamente un 50% p/p (peso/peso), así como que están sustancialmente libres de proteínas y contaminantes que interfieran. Algunas veces, los agentes tienen una pureza de al menos aproximadamente un 80% p/p y, más preferentemente, una pureza del al menos el 90 ó aproximadamente el 95% p/p. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, pueden obtenerse péptidos homogéneos con una pureza de al menos un 99% p/p.

El tratamiento puede usarse tanto en pacientes asintomáticos como en los que están mostrando actualmente síntomas de la enfermedad. Los anticuerpos usados pueden ser anticuerpos humanizados o quiméricos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la invención se refiere a la administración de anticuerpos preparados a partir de un humano inmunizado con péptido A β , pudiendo ser dicho ser humano el paciente a tratar con anticuerpo.

En otro aspecto, la invención se refiere a la administración de un anticuerpo con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse a un paciente mediante la administración de un polinucleótido que codifica al menos una cadena de anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y ligeras en el paciente. En realizaciones ejemplares, en el paciente se controla el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

De esta manera, la invención cumple una necesidad sentida desde hace mucho tiempo

de regímenes terapéuticos para prevenir o mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado con la enfermedad de Alzheimer.

A. Pacientes Susceptibles de Tratamiento

Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos con riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas, así como pacientes que muestran síntomas en ese momento. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera tiene riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive lo suficiente. Por lo tanto, los presentes procedimientos pueden administrarse profilácticamente a la población general sin necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente objeto. Los presentes procedimientos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Estos individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad, y los individuos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo para la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen de APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y en las posiciones 670 y 671 denominadas mutaciones de Hardy y Swedish respectivamente (véase Hardy, *supra*). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes de presenilina PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de AD, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que en ese momento padecen enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por una demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, se dispone de varios ensayos de diagnóstico para identificar individuos que tienen AD. Éstos incluyen la medición de los niveles de CSF tau y de A β 42. La elevación de los niveles de tau y la reducción de los niveles de A β 42 significa la presencia de AD. Los individuos que padecen enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse por el criterio ADRDA como se analiza en la sección de Ejemplos.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Sin embargo, normalmente no es necesario empezar el tratamiento hasta que un paciente alcanza 40, 50, 60 ó 70 años. El tratamiento típicamente implica múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. El tratamiento puede controlarse evaluando los niveles de anticuerpo a lo largo del tiempo. Si la respuesta se reduce, se indica una dosificación de refuerzo. En el caso de pacientes con un posible síndrome de Down, el tratamiento puede empezar antes del nacimiento mediante la administración del agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

B. Pautas de Tratamiento y Dosificaciones

En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible o por otra razón con riesgo de padecer la enfermedad

de Alzheimer, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones o medicamentos a un paciente que se sospecha o que ya padece dicha enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

En algunos usos, la administración del agente reduce o elimina el deterioro miocognitivo en pacientes que aún no han desarrollado una patología de Alzheimer característica. Una cantidad adecuada para conseguir el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéutica o profilácticamente eficaz. Tanto en los regímenes profilácticos como en los regímenes terapéuticos, los agentes normalmente se administran en varias dosificaciones hasta que se ha conseguido una respuesta inmune suficiente. La expresión “respuesta inmune” o “respuesta inmunológica” incluye el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) y/o una respuesta celular (mediada por linfocitos T con especificidad de antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra un antígeno en un sujeto receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa, es decir, inducida por la administración de un inmunógeno, o una respuesta pasiva, es decir, inducida por la administración de inmunoglobulinas o anticuerpos o linfocitos T cebados.

Un “agente inmunogénico” o “inmunógeno” puede inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo tras la administración a un mamífero, opcionalmente junto con un adyuvante. Típicamente, la respuesta inmune se controla y se administran dosificaciones repetidas si empieza a disminuir la respuesta inmune.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento necesitan titularse para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o estar dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferentemente al

menos 1 mg/kg. A los sujetos se les pueden administrar estas dosis diariamente, o en días alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por un análisis empírico. Un tratamiento ilustrativo implica la administración en múltiples dosificaciones durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Otros regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos procedimientos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los intervalos indicados.

El anticuerpo normalmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo contra A β en el paciente. En algunos procedimientos la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 μ g/ml y en otros procedimientos se ajusta para conseguir 25-300 μ g/ml. Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguidos de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos.

La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo de si es tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos a un paciente que todavía no padece el estado de enfermedad para mejorar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una “dosis profilácticamente eficaz”. En este uso, las cantidades precisas de nuevo dependen del estado de salud del paciente y de la inmunidad general, pero en general varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un período de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 200 mg de anticuerpo por dosis, usándose más comúnmente dosificaciones de 5 a 25 mg) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, al

paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Las dosis de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, de 100 ng a 100 mg, de 1 µg a 10 mg, o de 30 a 300 µg de ADN por paciente. Las dosis para infecciones por vectores virales varían de 10 a 100 o más viriones por dosis.

5 Los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico es la subcutánea, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más
10 típicamente en los músculos del brazo o pierna. En algunos procedimientos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. Se prefiere la inyección intramuscular o la infusión intravenosa para la administración del anticuerpo. En algunos procedimientos, los anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos procedimientos, los anticuerpos
15 se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™.

Los agentes de la invención opcionalmente pueden administrarse en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de una enfermedad amiloidogénica. En el caso de la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, en el que
20 se producen depósitos de amiloide en el cerebro, los agentes de la invención también pueden administrarse junto con otros agentes que aumentan el paso de los agente de la invención a través de la barrera hematoencefálica.

C. Composiciones Farmacéuticas

Los agentes de la invención con frecuencia se administran como composiciones
25 farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una diversidad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)). La forma preferida depende del modo de administración deseado y de la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o
30 diluyentes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que se definen como vehículos usados comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de dichos diluyentes agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank.
35 Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos,

adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos y no inmunogénicos y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como sepharose(TM) funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (tales como pequeñas gotas de aceite o liposomas). Además, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores (es decir adyuvantes).

Para la administración parenteral, los agentes de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Además, en las composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias para tamponar el pH y similares. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son los procedentes del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, son vehículos líquidos preferidos glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o una preparación de implante, que puede formularse de tal manera que se permita la liberación sostenida del principio activo. Una composición ilustrativa comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso constituido por L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para conseguir un efecto adyuvante mejorado, como se ha analizado anteriormente (véase Langer, Science 249: 1527 (1990) y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97 (1997)). Los agentes de esta invención pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante, que puede formularse de tal manera que se permita la liberación sostenida o pulsátil del principio activo.

Otras formulaciones adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. En el caso de los supositorios, aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; estos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en un intervalo del 0,5 al 10%, preferentemente del 1 al 2%. Las formulaciones orales

incluyen excipientes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 al 95% de principio activo, preferentemente del 25 al 70%.

La aplicación tópica puede dar como resultado una liberación transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse por coadministración del agente con toxina colérica o derivados destoxificados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn y col., Nature 391, 851 (1998)). La coadministración puede conseguirse usando los componentes como una mezcla o como moléculas asociadas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

Como alternativa, la liberación transdérmica puede conseguirse usando una vía a través de la piel o usando transferosomas (Paul y col., Eur. J. Immunol. 25:3521 (1995); Cevc y col., Biochem. Biophys. Acta 1368:201-15 (1998)).

III. Control del Curso de Tratamiento

La invención proporciona procedimientos para controlar el tratamiento en un paciente que padece o es susceptible de padecer la enfermedad de Alzheimer, es decir, para controlar un curso de tratamiento que se está administrando a un paciente. Los procedimientos pueden usarse para controlar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. En particular, los procedimientos son útiles para controlar la inmunización pasiva (por ejemplo, medir el nivel de anticuerpo administrado).

Algunos procedimientos implican la determinación de un valor basal, por ejemplo, de un nivel o perfil de anticuerpo en un paciente, antes de la administración de una dosificación de agente, y la comparación de éste con un valor para el perfil o nivel después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación típica de la media de dichas mediciones) en valor del nivel o perfil indica un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha conseguido una respuesta deseada). Si el valor para la respuesta inmune no cambia significativamente, o se reduce, se indica un resultado de tratamiento negativo.

En otros procedimientos se determina un valor de control (es decir, una media y desviación típica) del nivel o perfil para una población de control. Típicamente, los individuos de la población de control no han recibido un tratamiento previo. Los valores medidos del nivel o perfil en un paciente después de la administración de un agente terapéutico posteriormente se comparan con el valor de control. Un aumento significativo con respecto al valor de control (por

ejemplo, mayor que una desviación típica de la media) indica un resultado de tratamiento positivo o suficiente. La ausencia de un aumento significativo o una reducción indica un resultado de tratamiento negativo o insuficiente. La administración del agente generalmente se continúa mientras el nivel está aumentando con respecto al valor de control. Como se ha
5 indicado anteriormente, la obtención de un valor sostenido con respecto a los valores de control es un indicador de que la administración del tratamiento puede interrumpirse o reducirse en dosificación y/o frecuencia.

En otros procedimientos, se determina un valor de control del nivel o perfil (por ejemplo, una media y desviación típica) a partir de una población de control de individuos que han
10 experimentado tratamiento con un agente terapéutico y cuyos niveles o perfiles han alcanzado un valor sostenido en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de los niveles o perfiles en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, mayor que una desviación típica) del valor de control, el tratamiento puede interrumpirse. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo
15 del valor de control, se garantiza la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces puede indicarse un cambio en el tratamiento.

En otros procedimientos, en un paciente que actualmente no está recibiendo tratamiento pero se ha sometido a un curso previo de tratamiento se controlan los niveles o
20 perfiles de anticuerpo para determinar si se necesita reanudar el tratamiento. El nivel o perfil medido en el paciente puede compararse con un valor conseguido previamente en el paciente después de un curso de tratamiento previo. Una reducción significativa con respecto a la medición previa (es decir, mayor que un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento puede reanudarse. Como alternativa,
25 el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación típica) determinado en una población de pacientes después de experimentar un curso de tratamiento. Como alternativa, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen sin síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran
30 una mejoría de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una reducción significativa con respecto al nivel de control (es decir, mayor de una desviación típica) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en un paciente.

La muestra de tejido para el análisis es típicamente sangre, plasma, suero, fluido mucoso o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza, por ejemplo, con
35 respecto a los niveles o perfiles de anticuerpos contra el péptido A β , por ejemplo, niveles o

perfiles de anticuerpos humanizados. En la sección de Ejemplos se describen procedimientos ELISA para detectar anticuerpos específicos contra A β . En algunos procedimientos, el nivel o perfil de un anticuerpo administrado se determina usando un ensayo de eliminación, por ejemplo, en un ensayo de fagocitosis *in vitro*, como se describe en el presente documento. En estos procedimientos, una muestra de tejido de un paciente que se está ensayando se pone en contacto con depósitos amiloides (por ejemplo, de un ratón PDAPP) y células fagocíticas que llevan receptores de Fc. Después se controla la eliminación posterior del depósito de amiloides. La existencia y el grado de respuesta de eliminación proporcionan una indicación de la existencia y el nivel de anticuerpos eficaces para eliminar A β en la muestra de tejido del paciente bajo ensayo.

El perfil de anticuerpos después de la inmunización pasiva típicamente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpos seguido de una reducción exponencial. Sin una dosificación adicional, la reducción se aproxima a los niveles previos al tratamiento en un período de días a meses dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la semivida de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

En algunos procedimientos, se realiza una medición basal del anticuerpo contra A β en el paciente antes de la administración, se realiza una segunda medición poco después para determinar el nivel máximo de anticuerpo y se realizan una o más mediciones adicionales a intervalos para controlar la reducción de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo se ha reducido al valor basal o a un porcentaje predeterminado del pico menos el valor basal (por ejemplo, 50%, 25% o 10%), se realiza la administración de una dosificación adicional de anticuerpo. En algunos procedimientos, los niveles máximos o medidos posteriormente menos el nivel de fondo se comparan con niveles de referencia determinados previamente para constituir un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso en otros pacientes. Si el nivel de anticuerpo medido es significativamente menor que un nivel de referencia (por ejemplo, menor que la media menos una desviación típica del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento) se indica la administración de una dosificación adicional de anticuerpo.

Otros procedimientos incluyen el control, durante el transcurso del tratamiento, de cualquier síntoma fisiológico reconocido en la técnica (por ejemplo, síntomas físicos o mentales) en los que se basan rutinariamente los investigadores o médicos para diagnosticar o controlar enfermedades amiloidogénicas (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer). Por ejemplo, se puede controlar el deterioro cognitivo. Este último es un síntoma de la enfermedad de Alzheimer y del Síndrome de Down, pero también puede aparecer sin otras características de estas enfermedades. Por ejemplo, el deterioro cognitivo puede controlarse determinando la

puntuación de un paciente en el Mini-Examen del Estado Mental de acuerdo con la convención a lo largo del transcurso del tratamiento.

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan solamente con fines ilustrativos.

EJEMPLOS

5 **Ejemplo I. Eficacia Terapéutica de Anticuerpos Anti-A β : mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12 y pAb A β 1-42**

Este ejemplo ensaya la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales y policlonales contra A β de inhibir la acumulación de A β en el cerebro de ratones transgénicos heterocigotos.

A. Diseño del Estudio

10 Se obtuvieron sesenta ratones transgénicos PDAPP heterocigotos, machos y hembras, de 8,5 a 10,5 meses de edad, en Charles River Laboratory. Los ratones se clasificaron en seis grupos a tratar con diversos anticuerpos dirigidos contra A β . Los animales se distribuyeron de forma que fueran equivalentes en cuanto a sexo, edad, parentesco y procedencia de los animales dentro de los grupos en la medida de lo posible. La Tabla 2 representa el diseño experimental.

15

Tabla 2: Diseño Experimental

Grupo de Tratamiento	N ^a	Anticuerpo de Tratamiento	Especificidad de Anticuerpo	Isotipo de Anticuerpo
1	9	ninguno (PBS solo)	NA ^b	NA
2	10	Policlonal	A β 1-42	mixto
3	0	MAB ^d 2H3	A β 1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	A β 3-7	IgG1
5	6	mAb 266	A β 13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	A β 33-42	IgG2a
a. Número de ratones en el grupo al final del experimento. Todos los grupos empezaron con 10 animales por grupo. b. NA: no aplicable c. policlonal de ratón: anti-A β 42 agregado d. mAb: anticuerpo monoclonal				

20 Como se muestra en la Tabla 2, los anticuerpos incluían cuatro anticuerpos monoclonales murinos específicos de A β , 2H3 (dirigido a los restos 1-12 de A β), 10D5 (dirigido contra los restos 3-7 de A β), 266 (dirigido contra los restos 13-28 de A β y se une a AN1792 en forma soluble pero no agregada), 21F12 (dirigido contra los restos 32-42 de A β). Un quinto

grupo se trató con una fracción de anticuerpo policlonal específico de A β (inducido por inmunización con AN1792 en forma agregada). El grupo de control negativo recibió el diluyente, PBS, solo sin anticuerpo.

B. Control del Curso de Tratamiento

5 Los anticuerpos monoclonales se inyectaron a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg (suponiendo que los ratones pesaban 50 g). Los títulos de anticuerpos se controlaron durante las 28 semanas de tratamiento. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal cada 7 días en promedio para mantener los títulos de anti-A β por encima de 1000. Aunque se midieron títulos inferiores para el mAb 266 ya que no se une bien al AN1792
10 agregado usado como antígeno de captura en el ensayo, se mantuvo el mismo programa de dosificación para este grupo. El grupo que recibía anticuerpo monoclonal 2H3 se retiró dentro de las tres primeras semanas ya que el anticuerpo se eliminaba demasiado rápidamente *in vivo*.

15 Para la determinación de los títulos de anticuerpo, se extrajo sangre de una subserie de tres ratones elegidos aleatoriamente de cada grupo justo antes de cada inoculación intraperitoneal, para un total de 30 extracciones de sangre. Los títulos de anticuerpo se midieron como anticuerpos de unión a A β 1-42 usando una ELISA tipo sándwich con placas multipocillo de plástico revestidas con A β 1-42 como se describe con detalle en los Materiales y Procedimientos Generales. Los títulos medios para cada extracción de sangre se exponen en
20 la Tabla 3 para el anticuerpo policlonal y los monoclonales 10D5 y 21F12.

Tabla 3:

Semanas de 21F12	21F12	Semanas de 10D5	10D5	Semanas de poli	poli
0,15	500	0,15	3000	0,15	1600
0,5	800	0,5	14000	0,5	4000
1	2500	1	5000	1	4500
1,5	1800	1,1	5000	1,5	3000
2	1400	1,2	1300	2	1300
3	6000	2	3000	3	1600
3,5	550	3	4000	3,5	650
4	1600	3,5	500	4	1300
5	925	4	2400	5	450
6	3300	5	925	6	2100
7	4000	6	1700	7	1300
8	1400	7	1600	8	2300

9	1900	8	4000	9	700
10	1700	9	1800	10	600
11	1600	10	1800	11	600
12	1000	11	2300	12	1000
13	1500	12	2100	13	900
14	1300	13	2800	14	1900
15	1000	14	1900	15	1200
16	1700	15	2700	16	700
17	1700	16	1300	17	2100
18	5000	17	2200	18	1800
19	900	18	2200	19	1800
20	300	19	2500	20	1200
22	1750	20	980	22	1000
23	1600	22	2000	23	1200
24	1000	23	1000	24	675
25	1100	24	850	25	850
26	2250	25	600	26	1600
27	1400	26	1100	27	1900
28		27	1450	28	
		28			

Los títulos tuvieron un promedio de aproximadamente 1000 durante este período de tiempo para la preparación de anticuerpo policlonal y estuvieron ligeramente por encima de este nivel para los animales tratados con 10D5 y 21F12.

5 El tratamiento se continuó durante un período de 6 meses durante un total de 196 días. Los animales se sacrificaron una semana después de la dosis final.

C. Niveles de A β y APP en el Cerebro:

Después de aproximadamente seis meses de tratamiento con las diversas preparaciones de anticuerpo anti-A β , se extrajeron los cerebros de los animales después de perfusión salina. Se preparó un hemisferio para el análisis inmunohistoquímico y el segundo se usó para la cuantificación de los niveles de A β y APP. Para medir las concentraciones de diversas formas de péptido beta-amiloide y proteína precursora de amiloide (APP), el hemisferio se diseccionó y se prepararon homogeneizados de regiones del hipocampo, corticales y cerebelares en guanidina 5 M. Éstas se diluyeron en serie y se cuantificó el nivel de péptido amiloide o APP por comparación con una serie de diluciones de patrones de péptido

A β o APP de concentraciones conocidas en un formato ELISA.

Los niveles de A β total y de A β 1-42 medidos por ELISA en homogeneizados de la corteza y el hipocampo y el nivel de A β total en el cerebelo se muestran en las Tablas 4, 5 y 6, respectivamente. La mediana de la concentración de A β total para el grupo de control, inoculado con PBS, fue 3,6 veces mayor en el hipocampo que en la corteza (mediana de 63,389 ng/g de tejido de hipocampo en comparación con 17,818 ng/g para la corteza). La mediana del nivel en el cerebelo del grupo de control (30,6 ng/g de tejido) fue más de 2.000 veces menor que en hipocampo. Estos niveles son similares a los notificados previamente para ratones transgénicos PDAPP heterocigotos de esta edad (Johnson-Wood y col., *supra*).

Para la corteza, un grupo de tratamiento tenía una mediana del nivel de A β , medido como A β 1-42, que difería significativamente del valor del grupo de control ($p < 0,05$), los animales que recibieron el anticuerpo policlonal anti-A β como se muestra en la Tabla 4. La mediana del nivel de A β 1-42 se redujo en un 65%, en comparación con el control para este grupo de tratamiento. La mediana de los valores de A β 1-42 también se redujeron significativamente en un 55% en comparación con el control en un grupo de tratamiento adicional, los animales dosificados con el mAb 10D5 ($p = 0,0433$).

Tabla 4

<u>CORTEZA</u>									
Grupo de Tratamiento	N ^a	Medianas						Medias	
		A β Total			A β 42			A β Total	A β 42
		Valor ^b de ELISA	Valor ^c de P	% de cambio	Valor de ELISA	Valor de P	% de cambio	Valor de ELISA	Valor de ELISA
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	NA	16150+/- 7456	12621+/- 5738
Policlonal anti-A β 42	10	6160	0,0055	-65	4892	0,0071	-65	5912+/- 4492	4454+/- 3347
mAb 10D5	8	7915	0,1019	-56	6214	0,0433	-55	9695+/- 6929	6943+/- 3351
mAb 266	6	9144	0,1255	-49	8481	0,1255	-39	9204+/- 9293	7489+/- 6921
mAb 21F12	8	15158	0,2898	-15	13578	0,7003	-2	12481+/- 7082	11005+/- 6324

Notas al pie:

- a. Número de animales por grupo al final del experimento
- b. ng/g de tejido
- c. Análisis de Mann Whitney
- d. NA: no aplicable
- e. Desviación Típica

En el hipocampo, la mediana de la reducción en porcentaje del A β total asociado con el tratamiento con anticuerpo policlonal anti-A β (50%, $p = 0,0055$) no fue tan grande como la observada en la corteza (65%) (Tabla 5). Sin embargo, la magnitud absoluta de la reducción fue casi tres veces mayor en el hipocampo en comparación con la corteza, una reducción neta de 31.683 ng/g de tejido en el hipocampo frente a 11.658 ng/g de tejido en la corteza. Cuando se midió como el nivel de la forma más amiloidogénica de A β , A β 1-42, en lugar de como A β total, la reducción conseguida con el anticuerpo policlonal fue significativa ($p = 0,0025$). La mediana de los niveles en los grupos tratados con los mAb 10D5 y 266 se redujeron en un 33% y 21% respectivamente.

Tabla 5

HIPOCAMPO									
Grupo de Tratamiento	N ^a	Medianas						Medias	
		Aβ Total			Aβ42			Aβ Total	Aβ42
		Valor de ELISA ^b	Valor de P ^c	% de Cambio	Valor de ELISA	Valor de P	% de Cambio	Valor de ELISA	Valor de ELISA
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308 ^e	52801+/-14701
Policlonal anti-Aβ42	10	31706	0,0055	-50	27127	0,0025	-50	30058+/-22454	24853+/-18262
mAb 10D5	8	46779	0,0675	-26	36290	0,0543	-33	44581+/-18632	36465+/-17146
mAb 266	6	48689	0,0990	-23	43034	0,0990	-21	36419+/-27304	32919+/-25372
mAb 21F12	8	51563	0,7728	-19	47961	0,8099	-12	57327+/-28927	50305+/-23927

Notas al pie:

- a. Número de animales por grupo al final del experimento
- b. ng/g de tejido
- c. Análisis de Mann Whitney
- d. NA: no aplicable
- e. Desviación Típica

También se midió el A β total en el cerebelo (Tabla 6). Los grupos dosificados con el policlonal anti-A β y el anticuerpo 266 mostraron reducciones significativas de los niveles de A β total (43% y 46%, $p = 0,0033$ y $p = 0,0184$, respectivamente) y el grupo tratado con 10D5 tuvo una reducción casi significativa (29%, $p = 0,0675$).

Tabla 6

<u>CEREBELO</u>					
Grupo de Tratamiento	N ^a	Medianas			Medias
		A β Total			A β Total
		Valor ^b de ELISA	Valor ^c de P	% de Cambio	Valor de ELISA
PBS	9	30,64	NA ^d	NA	40,00+/-31,89 ^e
Policlonal anti-A β 42	10	17,61	0,0033	-43	18,15+/-4,36
mAb 10D5	8	21,68	0,0675	-29	27,29+/-19,43
mAb 266	6	16,59	0,0184	-46	19,59+/-6,59
mAb 21F12	8	29,80	>0,9999	-3	32,88+/-9,90
a. Número de animales por grupo al final del experimento b. ng/g de tejido c. Análisis de Mann Whitney d. NA: no aplicable e. Desviación Típica					

También se determinó la concentración de APP por ELISA en la corteza y cerebelo de ratones tratados con PBS, de control y tratados con anticuerpo. Se utilizaron dos ensayos de APP diferentes. El primero, denominado APP- α /FL, reconoce tanto APP-alfa (α , la forma secretada de APP que se ha escindido dentro de la secuencia de A β), como la forma de longitud completa (FL) de APP, mientras que el segundo reconoce sólo APP- α . En contraste con la disminución asociada con el tratamiento de A β en una subserie de grupos de tratamiento, los niveles de APP permanecieron prácticamente sin cambios en todos los

animales tratados en comparación con los animales de control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con anticuerpos contra A β reducen A β sin reducir APP.

En resumen, los niveles de A β se redujeron significativamente en la corteza, hipocampo y cerebelo en los animales tratados con el anticuerpo policlonal inducido contra AN1792. En una menor medida, los anticuerpos monoclonales contra la región amino terminal de A β ₁₋₄₂, específicamente los aminoácidos 1-16 y 13-28 también mostraron efectos significativos del tratamiento.

D. Análisis Histoquímico:

Se comparó cualitativamente la morfología de placas inmunorreactivas con A β en subseries de cerebros de ratones en los grupos de tratamiento de PBS, policlonal A β ₄₂, 21F12, 266 y 10D5 con la de estudios previos en los que se siguieron procedimientos de inmunización convencionales con A β ₄₂.

La máxima alteración tanto en el grado como en la aparición de placas de amiloide se produjo en los animales inmunizados con el anticuerpo policlonal A β ₄₂. La reducción de la carga amiloide, la morfología de placas reducidas y la inmunorreactividad de A β asociado con células se parecían mucho a los efectos producidos por el procedimiento de inmunización convencional. Estas observaciones confirman los resultados del ELISA en el que se consiguieron reducciones significativas tanto en A β total como en A β ₄₂ mediante la administración del anticuerpo policlonal A β ₄₂.

En evaluaciones cualitativas similares, también se redujeron las placas de amiloide en el grupo de 10D5 en número y en aparición, con alguna evidencia de inmunorreactividad de A β asociada a las células. Con respecto a los animales tratados con el control, la fracción de Ig policlonal contra A β y uno de los anticuerpos monoclonales (10D5) redujo la carga de placas en un 93% y 81%, respectivamente ($p < 0,005$). 21F12 parecía tener un efecto relativamente modesto sobre la carga de placas. Las micrografías de cerebro después del tratamiento con pAbA β ₁₋₄₂ muestran depósitos difusos y la ausencia de muchas de la placas compactadas de mayor tamaño en el grupo tratado con pAbA β ₁₋₄₂ con respecto a los animales tratados de control.

E. Respuestas Linfoproliferativas

Se midió la linfoproliferación dependiente de A β usando células de bazo recogidas ocho días después de la infusión final de anticuerpo. Las células recién recogidas, 10^5 por pocillo, se cultivaron durante 5 días en presencia de A β ₁₋₄₀ a una concentración de 5 μ M para la estimulación. Como control positivo, se cultivaron células adicionales con el mitógeno de linfocitos T, PHA y, como control negativo, se cultivaron células sin péptido añadido.

Se estimularon esplenocitos de ratones PDAPP de edad avanzada inmunizados

pasivamente con diversos anticuerpos anti-A β *in vitro* con AN1792 y se midieron las respuestas proliferativas y de citocinas. El objetivo de estos ensayos era determinar si la inmunización pasiva facilitaba la presentación del antígeno y, por lo tanto, el cebado de respuesta de linfocitos T específicas para AN1792. No se observó ninguna respuesta proliferativa específica de AN1792 o de citocinas en ratones inmunizados pasivamente con los anticuerpos anti-A β .

Ejemplo II: Eficacia Terapéutica de Anticuerpos Anti-A β : mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12, mAb 3D6, mAb 16C11 y pAb A β 1-42

En un segundo estudio, se repitió el tratamiento con 10D5 y se ensayaron dos anticuerpos anti-A β adicionales, los monoclonales 3D6 (A β 1-5) y 16C11 (A β 33-42). Los grupos de control recibieron PBS o un anticuerpo irrelevante de isotipo correspondiente (TM2a). Los ratones eran de mayor edad (11,5-12 meses de edad heterocigotos) que en el estudio previo, pero por lo demás el diseño experimental era igual. De nuevo, después de seis meses de tratamiento, 10D5 redujo la carga de placas en más de un 80% con respecto a los controles de PBS o de anticuerpo de isotipo correspondiente ($p = 0,003$). Uno de los otros anticuerpos contra A β , 3D6, fue igualmente eficaz, produciendo una reducción del 86% ($p = 0,003$). Por el contrario, el tercer anticuerpo contra el péptido, 16C11, no tuvo ningún efecto sobre la carga de placas. Se obtuvieron descubrimientos similares con las mediciones ELISA de A β 42.

Estos resultados demuestran que una respuesta de anticuerpos contra el péptido A β , en ausencia de inmunidad de linfocitos T, es suficiente para reducir la deposición de amiloides en ratones PDAPP, pero que no todos los anticuerpos anti-A β son igualmente eficaces. Los anticuerpos dirigidos contra epítopes que comprenden los aminoácidos 1-5 ó 3-7 de A β son particularmente eficaces. En resumen, puede demostrarse que anticuerpos administrados pasivamente contra A β (es decir, inmunización pasiva) reducen el grado de deposición de placas en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo III: Control de Unión de Anticuerpos en el SNC

Este Ejemplo demuestra que cuando se mantuvieron a concentraciones modestas en suero (25-70 $\mu\text{g/ml}$), los anticuerpos tuvieron acceso al SNC a niveles suficientes para decorar las placas de β -amiloide.

Para determinar si anticuerpos contra A β podían actuar directamente dentro del SNC, se examinaron cerebros extraídos de ratones perfundidos con solución salina al final del Ejemplo II con respecto a la presencia de los anticuerpos administrados periféricamente. Se expusieron secciones cerebrales de criostato no fijadas a un reactivo fluorescente contra inmunoglobulina de ratón (IgG-Cy3 de cabra anti-ratón). Las placas dentro de los cerebros de los grupos de 10D5 y 3D6 se decoraron fuertemente con anticuerpo, mientras que no hubo

tinción en el grupo de 16C11. Para revelar el grado completo de deposición de placas, primero se hicieron reaccionar inmunológicamente secciones seriadas de cada cerebro con un anticuerpo anti-A β , y después con el reactivo secundario. 10D5 y 3D6, después de la administración periférica, consiguieron acceso a la mayoría de las placas dentro del SNC. La carga de placas se redujo en gran medida en estos grupos de tratamiento en comparación con el grupo de 16C11. La entrada de anticuerpos en el SNC no se debía a una fuga anómala a través de la barrera hematoencefálica, ya que no hubo ningún aumento de permeabilidad vascular como se mide por Azul de Evans en ratones PDAPP. Además, la concentración de anticuerpo en el parénquima cerebral de ratones PDAPP de edad avanzada fue la misma que en ratones no transgénicos, representando el 0,1% de la concentración de anticuerpo en suero (independientemente del isotipo).

Estos datos indican que los anticuerpos administrados periféricamente pueden entrar en el SNC donde pueden inducir directamente la eliminación de amiloide. Es probable que 16C11 también tuviera acceso a las placas pero no pudiera unirse.

Ejemplo IV: Ensayo de Exploración Ex vivo de la Actividad de un Anticuerpo Contra Depósitos Amiloides.

Para examinar el efecto de anticuerpos sobre la eliminación de placas, los presentes solicitantes establecieron un ensayo *ex vivo* en el que se cultivaron células primarias de la microglía con secciones de criostato no fijadas de ratón PDAPP o cerebros AD humanos. Se obtuvieron células de la microglía de las cortezas cerebrales de ratones DBA/2N recién nacidos (1-3 días). Las cortezas se disociaron mecánicamente en HBSS⁻ (Solución Salina Equilibrada de Hanks, Sigma) con 50 μ g/ml de DNasa I (Sigma). Las células disociadas se filtraron con un filtro celular de 100 μ m (Falcon), y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de crecimiento (DMEM de alto contenido de glucosa, FBS al 10%, 25 ng/ml de rmGM-CSF), y las células se cultivaron a una densidad de 2 cerebros por matraz de cultivo de plástico T-75. Después de 7-9 días, los matraces se rotaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 h a 37°C. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm y se resuspendió en el medio de ensayo.

Se montaron descongeladas secciones de criostato de 10 μ m de cerebros AD humanos o de ratón PDAPP (intervalo post mórtem < 3 h) sobre cubreobjetos de vidrio redondos revestidos de polilisina y se pusieron en pocillos de placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con medio de ensayo que consistía en H-SFM (medio sin suero de Hibridoma, Gibco BRL) con FBS al 1%, glutamina, penicilina/estreptomicina y 5 ng/ml de rmGM-CSF (R&D). Se añadieron anticuerpos de control o anti-A β a una concentración 2x (5 μ g/ml final) durante 1 hora. Después se sembraron las células de microglía

a una densidad de $0,8 \times 10^6$ células/ml de medio de ensayo. Los cultivos se mantuvieron en un incubador humidificado (37°C , 5% de CO_2) durante 24 horas o más. Al final de la incubación, los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton-X 100 al 0,1%. Las secciones se tiñeron con 3D6 biotinilado seguido de conjugado de estreptavidina/Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Las células de la microglía exógenas se visualizaron mediante una tinción nuclear (DAPI). Los cultivos se observaron con un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon, TE300) y se tomaron fotomicrografías con una cámara digital SPOT usando un software SPOT (Diagnostic Instruments). Para el análisis de la transferencia de Western, los cultivos se extrajeron en urea 8 M, se diluyeron 1:1 en tampón de muestra de tricina reductor y se cargaron en un gel de tricina al 16% (Novex). Después de la transferencia en immobilon, las manchas de transferencia se expusieron a $5 \mu\text{g/ml}$ del pabA β 42 seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP y se revelaron con ECL (Amersham).

Cuando el ensayo se realizó con secciones cerebrales de PDAPP en presencia de 16C11 (uno de los anticuerpos contra A β que no era eficaz *in vivo*), las placas de β -amiloide permanecieron intactas y no se observó fagocitosis. Por el contrario, cuando se cultivaron secciones adyacentes en presencia de 10D5, los depósitos de amiloide desaparecieron en gran medida y las células de la microglía mostraron numerosas vesículas fagocíticas que contenían A β . Se obtuvieron resultados idénticos con secciones cerebrales de AD; 10D5 indujo la fagocitosis de placas AD, mientras que 16C11 era ineficaz. Además, el ensayo proporcionó resultados comparables cuando se realizó con células de microglía humanas o de ratón, y con anticuerpos de ratón, conejo o primate contra A β .

La Tabla 7 compara la unión de A β frente a la fagocitosis para varias especificidades de unión de anticuerpos diferentes. Puede verse que los anticuerpos que se unen a epítopes dentro de los aa 1-7 se unen y eliminan depósitos amiloides, mientras que los anticuerpos que se unen a epítopes dentro de los aminoácidos 4-10 se unen sin eliminación de los depósitos amiloides. Los anticuerpos que se unen a epítopes C-terminales al resto 10 ni se unen ni eliminan depósitos amiloides.

Tabla 7: Análisis de Especificidad de Epítopo

	Anticuerpo		Tinción	Fagocitosis
	epítopo	isotipo		
Extremo N				
mab				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-7	IgG1	+	+

22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	IgG1 de rata	+	-

aa 13-28

18G11	10-18	IgG1 de rata	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-

Extremo C

2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-

Suero Inmune

conejo (CFA)	1-6		+	+
ratón (CFA)	3-7		+	+
ratón (QS-21)	3-7		+	+
mono (QS-21)	1-5		+	+
ratón (MAP1- 7)			+	+

La Tabla 8 muestra resultados obtenidos con varios anticuerpos contra A β , que comparan sus capacidades de inducir la fagocitosis en el ensayo *ex vivo* y de reducir la carga de placas *in vivo* en estudios de transferencia pasiva. Aunque 16C11 y 21F12 se unían al péptido A β sintético agregado con una alta avidéz, estos anticuerpos no podían reaccionar con placas de β -amiloide en secciones cerebrales no fijadas, no podían desencadenar fagocitosis en el ensayo *ex vivo* y no eran eficaces *in vivo*. 10D5, 3D6, y el anticuerpo policlonal contra A β eran activos por las tres medidas. Estos resultados muestran que la eficacia *in vivo* se debe a la eliminación directa mediada por anticuerpo de las placas dentro del SNC, y que el ensayo *ex vivo* es predictivo de la eficacia *in vivo*.

Tabla 8: El ensayo *ex vivo* como predicción de la eficacia *in vivo*

Anticuerpo	Isotipo	Avidéz por A β agregado (pM)	Unión a placas β -amiloides	Eficacia <i>Ex vivo</i>	Eficacia <i>In vivo</i>
monoclonal					

3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
policlonal					
1-42	mezcla	600	+	+	+

El mismo ensayo se ha usado para ensayar la actividad de eliminación de un anticuerpo contra un fragmento de sinucleína denominado NAC. Se ha mostrado que la sinucleína es una proteína asociada a placas de amiloide. Un anticuerpo contra NAC se puso en contacto con una muestra de tejido cerebral que contenía placas de amiloide y células de microglía como se ha indicado anteriormente. Se usó suero de conejo como control. El control posterior mostró una notable reducción en el número y tamaño de placas que indicaba actividad de eliminación del anticuerpo.

Se usó microscopía confocal para confirmar que el A β se internalizaba durante el transcurso del ensayo *ex vivo*. En presencia de anticuerpos de control, las células de la microglía exógenas se mantenían en un plano confocal encima del tejido, no había vesículas fagocíticas que contuvieran A β y las placas permanecían intactas dentro de la sección. En presencia de 10D5, casi todo el material de las placas estaba contenido en vesículas dentro de las células de microglía exógenas. Para determinar el destino del péptido internalizado, se extrajeron cultivos tratados con 10D5 con urea 8 M a diversos puntos de tiempo, y se examinaron por análisis de transferencia de Western. En el punto de tiempo de una hora, cuando aún no se había producido fagocitosis, la reacción con un anticuerpo policlonal contra A β reveló una fuerte banda de 4 kD (correspondiente al péptido A β). La inmunorreactividad de A β se redujo el día 1 y estaba ausente el día 3. De esta manera, la fagocitosis mediada por anticuerpo de A β conduce a su degradación.

Para determinar si la fagocitosis en el ensayo *ex vivo* estaba mediada por Fc, se prepararon fragmentos F(ab')₂ del anticuerpo anti-A β . Aunque los fragmentos F(ab')₂ retenían su capacidad total de reaccionar con placas, no pudieron desencadenar la fagocitosis por células de la microglía. Además, la fagocitosis con el anticuerpo entero pudo bloquearse por un reactivo contra receptores de Fc murinos (anti-CD16/32). Estos datos indican que la eliminación *in vivo* de A β se produce a través de fagocitosis mediada por receptor de Fc.

Ejemplo V: Paso de Anticuerpos a Través de la Barrera Hematoencefálica

Este ejemplo determina la concentración de anticuerpo suministrada al cerebro

después de la inyección intravenosa en un tejido periférico de ratones normales o PDAPP. Después del tratamiento, se perfundió en ratones PDAPP o de control normales NaCl al 0,9%. Se diseccionaron regiones cerebrales (hipocampo o corteza) y se congelaron rápidamente. El cerebro se homogeneizó en tritón al 0,1% + inhibidores de proteasa. Se detectó inmunoglobulina en los extractos por ELISA. Se aplicó F(ab)'₂ de cabra anti-IgG de ratón como un revestimiento sobre una placa de RIA como reactivo de captura. El suero o los extractos de cerebro se incubaron durante 1 h. Los isotipos se detectaron con IgG1-HRP anti-ratón o IgG2a-HRP o IgG2b-HRP (Caltag). Los anticuerpos, independientemente del isotipo, estaban presentes en el SNC a una concentración que es 1:1000 con respecto a la encontrada en la sangre. Por ejemplo, cuando la concentración de IgG1 fue tres veces la de IgG2a en la sangre, también fue tres veces la de IgG2a en el cerebro, estando presentes ambas al 0,1% de sus niveles respectivos en la sangre. Este resultado se observó tanto en ratones transgénicos como en ratones no transgénicos, lo que indica que los ratones PDAPP no tienen exclusivamente una barrera hematoencefálica con fugas.

Ejemplo VI: Clonación y Secuenciación de las Regiones Variables de 3D6 de Ratón

Clonación y Análisis de Secuencia de VH de 3D6. La región variable de cadena pesada VH de 3D6 se clonó por RT-PCR usando ARNm preparado a partir de células de hibridoma por dos procedimientos independientes. En el primero, se emplearon cebadores consenso contra el péptido líder de la región VH que incluía el codón de inicio de la traducción como cebador 5' (ADN N° 3818-3829), y un cebador 3' específico de regiones constantes de g2b (ADN N° 3832). Las secuencias del producto amplificado por PCR, así como de múltiples clones obtenidos independientemente, concordaron completamente entre sí. Como comprobación adicional de la secuencia de la región VH de 3D6, el resultado se confirmó por secuenciación de un fragmento de VH obtenido por la metodología 5' RACE RT-PCR y el cebador específico 3' g2b (ADN N° 3832). De nuevo, la secuencia se obtuvo a partir del producto de PCR, así como de múltiples clones aislados independientemente. Las dos secuencias concuerdan completamente entre sí (con la excepción de la sustitución de V8I en la región líder del producto 5' RACE), indicando que las secuencias proceden del ARNm que codifica la región VH de 3D6. La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 3) y de aminoácidos (SEC ID N°: 4) de la región VH de 3D6 se exponen en la Tabla 9A y en la Figura 2, respectivamente.

Tabla 9A: Secuencia de Nucleótidos de VH de 3D6 de Ratón

ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGA
 AGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTCT
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGAAT
 TCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTTCATCCATTAGGAGTGGTGGTGTAGAACCTACTA
 TTCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCTGT
 ACCTGCAAATGAGTAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTGTGTCAGATAT
 GATCACTATAGTGGTAGCTCCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCT (SEC ID N°: 3)

*El péptido líder está subrayado

Clonación y Análisis de la Secuencia de VL de 3D6. La región variable de cadena ligera VL de 3D6 se clonó de una manera análoga a la región VH. En el primer ensayo, se diseñó un conjunto de cebadores consenso para la amplificación de regiones VL murinas como se indica a continuación: se diseñaron cebadores 5' (ADN N° 3806-3816) para hibridar con la región VL que incluía el codón de inicio de la traducción y un cebador 3' (ADN N° 3817) fue específico para la región Ck murina cadena debajo de la región de unión V-J. El análisis de la secuencia de ADN del fragmento de PCR, así como de clones obtenidos independientemente aislados usando esta serie de cebadores de cadena ligera consenso, reveló que el ADNc obtenido procedía de un mensajero no reorganizado funcionalmente, ya que la secuencia contenía una mutación de cambio de fase entre la región V-J.

En un segundo ensayo, se empleó 5'RACE para clonar un segundo ADNc codificante de VL. El análisis de la secuencia de ADN de este producto (consenso 11) mostró que codificaba un ARNm funcional. De esta manera, puede concluirse que la secuencia codifica el ARNm de cadena ligera de 3D6 correcto. La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 1) y de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de la región VL de 3D6 se exponen en la Tabla 9B y en la Figura 1, respectivamente.

Tabla 9B: Secuencia de Nucleótidos de VL de 3D6 de Ratón.

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTTCGGGAAACCAACGG
TTATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTTCGGTTACCATTTGGACAACCAGCCT
 CCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAAT
 TGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACT
 GGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTGA
 AAATCAGCAGAATAGAGGCTGAGGATTTGGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACAT
 TTTCTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEC ID N°: 1)

*El péptido líder está subrayado

En la Tabla 10 se exponen los cebadores usados para la clonación del ADNc de VL de 3D6.

ADN	Tamaño	¿Cadena codificante?	Secuencia de ADN	Comentarios
3806	40	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.GTT.GCC.TGT.TAG.GCT.GTT.GGT.GCT.G (SEC ID Nº: 39)	cebador 1 de variable kappa de ratón % A+T = 50,00 [20]; % C+G = 50,00 [20] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 72,90
3807	39	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.GWC.AGA.CAC.ACT.CCT.GYT.ATG.GGT (SEC ID Nº: 40)	cebador 2 de variable kappa de ratón, CEBADOR 2 MKV, serie MRC; A+T = 46,15 [18]; % C+G = 48,72 [19] Davis, Botstein, Roth, Temperatura de Fusión C. 72,05
3808	40	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.TGT.GCT.CAC.TCA.GGT.CCT.GGS.GTT.G (SEC ID Nº: 41)	cebador 3 de variable kappa de ratón CEBADOR 3 MKV, serie MRC; % A+T = 45,00 [18]; % C+G = 52,50 [21] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 73,93
3809	43	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.GRC.CCC.TGC.TCA.GWT.TYT.TGG.MWT.CTT.G (SEC ID Nº: 42)	cebador 4 de variable kappa de ratón, CEBADOR 4 MKV, serie MRC; % A+T = 41,86 [18]; % C+G = 46,51 [20] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 72,34

3810	40	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TTT.WCA.GGT.GCA. GAT.TWT.CAG.CTT.C (SEC ID Nº: 43)	cebador 5 de variable kappa de ratón CEBADOR 5, serie MRC; % A+T = 52,50 [21]; % C+G = 42,50 [17] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 69,83
3811	37	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.GTK.CYY.TGY.TSA.G YT.YCT.GRG.G (SEC ID Nº: 44)	Cebador 6 de variable kappa de ratón; % A+T = 37,84 [14]; % C+G = 40,54 [15] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 68,01
3812	41	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.CWT.CAA.GAT.GGA. GTC.ACA.KWY.YCW.GG (SEC ID Nº: 45)	cebador 7 de variable kappa de ratón, CEBADOR 7, serie MRC; % A+T = 39,02 [16]; % C+G = 46,34 [19] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 71,70
3813	41	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GTG.GGG.AYC.TKT.TTY.C MM.TTT.TTC.AAT.TG (SEC ID Nº: 46)	cebador 8 de variable kappa de ratón CEBADOR 8, serie MRC; % A+T = 53,66 [22]; % C+G = 34,15 [14] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 66,70

3814	35	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGT.RTC.CWC.ASC.TCA.GTT.CCT.TG (SEC ID Nº: 47)	cebador 9 de variable kappa de ratón % A+T = 45,71 [16]; % C+G = 45,71 [16] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 69,36
3815	37	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GTA.TAT.ATG.TTT.GTT.GTC.TAT.TTC.T (SEC ID Nº: 48)	cebador 10 de variable kappa de ratón CEBADOR 10, serie MRC; % A+T = 70,27 [26]; % C+G = 29,73 [11] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 63,58
3816	38	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.AGC.CCC.AGC.TCA.GCT.TCT.CTT.CC (SEC ID Nº: 49)	cebador 11 de variable kappa de ratón CEBADOR 11, serie MRC; % A+T = 44,74 [17]; % C+G = 55,26 [21] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 74,40
3817	27	No	GGA.TCC.CGG.GTG.GAT.GGT.GGG.AAG.ATG (SEC ID Nº: 50)	cebador inverso de cadena ligera kappa de ratón, aa 116-122; cebador de región constante de Ck, serie MRC + sitio Smal; % A+T = 47,06 [8]; % C+G = 52,94 [9] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 57,19

3818	37	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.ATG.CAG.CTG.GGT.C AT.STT.CTT.C (SEC ID Nº: 51)	cebador 1 de variable de cadena pesada de ratón; cebador 1 MHV, serie MRC;
3819	36	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.ATG.GAG.CTR.TAT.C AT.SYT.CTT (SEC ID Nº: 52)	cebador 2 de variable de cadena pesada de ratón; cebador 2 MHV, serie MRC;
3820	37	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.GWT.GTG.GTT.AAA. CTG.GGT.TTT.T (SEC ID Nº: 53)	cebador 3 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 3 MHV, serie MRC;
3821	35	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GRA.CTT.TGG.GYT.CAG.C TT.GRT.TT (SEC ID Nº: 54)	cebador 4 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 4 MHV, serie MRC;
3822	40	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.CTC.CAG.GCT. CAA.TTT.AGT.TTT.CCT.T (SEC ID Nº: 55)	cebador 5 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 5, serie MRC; cebador 5 MHV, serie MRC;
3823	37	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGC.TGT.CYT.RGS. GCT.RCT.CTT.CTG.C (SEC ID Nº: 56)	cebador 6 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 6 MHV, serie MRC;
3824	36	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGR.ATG.GAG.CKG. GRT.CTT.TMT.CTT (SEC ID Nº: 57)	cebador 7 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 7 MHV, serie MRC;
3825	33	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.AGT.GCT.GAT.TCT.T TT.GTG (SEC ID Nº: 58)	cebador 8 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 8 MHV, serie MRC;

3826	40	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGM.TTG.GGT.GTG.GAM. CTT.GCT.ATT.CCT.G (SEC ID N°: 59)	cebador 9 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 9, serie MRC;
3827	37	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.CAG.ACT.TAC. ATT.CTC.ATT.CCT.G (SEC ID N°: 60)	cebador 10 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 10 MHV, serie MRC;
3828	38	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TTT.TGG.GCT.GAT.T TT.TTT.TAT.TG (SEC ID N°: 61)	cebador 11 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 11 MHV, serie MRC;
3829	37	Sí	ACT.AGT.CGA.CAT.GAT.GGT.GTT.AAG.TCT.T CT.GTA.CCT.G (SEC ID N°: 62)	cebador 12 de variable de cadena pesada de ratón, cebador 12 MHV, serie MRC;
3832	7.7	No	GGA.TCC.CGG.GAG.TGG.ATA.GAC.tGA.TGG (SEC ID N°: 63)	cadena pesada de IgG2b de ratón posición de aa 119-124, serie MRC;

Desde el extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR2 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con la convención de numeración de Kabat y col. *supra*.

- 5 *Expresión de Anticuerpo 3D6 Quimérico:* Las regiones de cadena pesada y ligera variables se volvieron a modificar por ingeniería genética para codificar secuencias donadoras de corte y empalme cadena debajo de las uniones VDJ o VJ respectivas, y se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCMV-hy1 para la cadena pesada, y pCMV-hk1 para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes Ck y $\gamma 1$ humanas como
- 10 fragmentos exónicos cadena abajo del casete de región variable insertado. Después de la verificación de la secuencia, los vectores de expresión de cadena ligera y de cadena pesada se cotransfectaron en células COS. Dos clones de cadena pesada diferentes (H2.2 y H3.2) se cotransfectaron independientemente con tres clones de cadena ligera quiméricos diferentes (L3, L4 y L10) para confirmar la reproducibilidad del resultado. Como control positivo para los
- 15 vectores se realizó una transfección del anticuerpo 21.6 quimérico. Los medios acondicionados

se recogieron 48 horas después de la transfección y se ensayaron por análisis de transferencia de Western para la producción de anticuerpo o ELISA para la unión a A β .

Los múltiples transfectantes expresaban combinaciones de cadena ligera + cadena pesada que se reconocen por un anticuerpo IgG de cabra anti-humano (H+L) en una transferencia de Western.

La unión directa de los anticuerpos 3D6 y 3D6 quimérico (PK1614) a A β se ensayó por análisis ELISA. Se descubrió que 3D6 quimérico se unía a A β con alta avidéz, similar a lo demostrado por 3D6 (Figura 3A). Además, un ensayo de inhibición competitivo basado en ELISA reveló que el anticuerpo 3D6 quimérico y el anticuerpo 3D6 murino competían igualmente con la unión a 3D6 biotinilado a A β (Figura 3B). El anticuerpo quimérico presentaba propiedades de unión indistinguibles de la muestra de referencia de 3D6.

Tabla 11

Conc (μ g/ml)	3D6	PK1614	IgG1
0,37		119,3	
0,11	18,6	118,9	
0,33	99,7	71,25	
1	98,63	84,53	134,4

Además, tanto 3D6 como PK1614 eran eficaces para eliminar las placas de A β . El ensayo *ex vivo* demuestra que según aumenta la concentración de anticuerpo, la cantidad de A β se reduce de una forma similar para los anticuerpos 3D6 tanto quiméricos como murinos. Por lo tanto, puede concluirse que las secuencias codifican cadenas pesadas y cadenas ligeras de 3D6 funcionales respectivamente.

Ejemplo VII. Humanización de 3D6

Homología/Formación de Modelos Moleculares. Para identificar restos de marco conservado estructurales clave en el anticuerpo 3D6 murino, se generó un modelo tridimensional basándose en los anticuerpos murinos más parecidos para las cadenas pesada y ligera. Para este fin, se eligió un anticuerpo denominado 1 CR9 como molde para modelar la cadena ligera de 3D6 (PDB ID: 1CR9, Kanyo y col., supra), y se eligió un anticuerpo denominado 1OPG como molde para modelar la cadena pesada. (PDB ID: 1OPG Kodandapani y col., supra). (Véase también la Tabla 1). El alineamiento de secuencias de aminoácidos de 3D6 con la cadena ligera y la cadena pesada de estos anticuerpos reveló que, con la excepción de CDR3 de la cadena pesada, los anticuerpos 1CR9 y 1OPG comparten una

homología de secuencia significativa con 3D6. Además, los bucles de CDR de los anticuerpos seleccionados están dentro de las mismas clases estructurales canónicas de Chothia que los bucles de CDR de 3D6, exceptuando de nuevo CDR3 de la cadena pesada. Por lo tanto, 1CR9 y 1OPG se seleccionaron inicialmente como anticuerpos de estructura resuelta para la creación de modelos de homología de 3D6.

Se construyó un modelo de homología de primer paso de región variable de 3D6 basado en los anticuerpos indicados anteriormente usando el paquete de software Look & SegMod Modules GeneMine (v3.5). Este software se adquirió bajo una licencia perpetua de Molecular Applications Group (Palo alto, CA). Este paquete de software, autorizado por Drs. Michael Levitt y Chris Lee, facilita el procedimiento de modelado molecular por automatización de las etapas implicadas en el modelado estructural de una secuencia primaria de un molde de estructura conocida basándose en homología de secuencias. Trabajando en una terminal de trabajo Silicon Graphics IRIS en un entorno UNIX, la estructura modelada se refina automáticamente por una serie de etapas de minimización de energía para aliviar contactos atómicos desfavorables y optimizar las interacciones electrostáticas y de van der Waals.

Se construyó otro modelo refinado usando la capacidad de modelado de Quanta®. Una consulta de la base de datos PDB con CDR3 de la cadena pesada de 3D6 identificó a 1qkz como el más homólogo y que tenía el mismo número de restos que 3D6. Por lo tanto, la CDR3 de la cadena pesada de 3D6 se modeló usando la estructura cristalina de 1qkz como molde. En la Figura 4 se muestra el trazo del esqueleto de α -carbono del modelo de 3D6. El dominio de VH se muestra como una línea punteada, y el dominio VL se muestra como una línea continua, y los bucles de CDR se indican en forma de cinta.

Selección de Secuencias de Anticuerpo Aceptor Humano. Se identificaron secuencias de anticuerpo aceptor humano adecuadas por comparaciones por ordenador de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se realizó por separado para las cadenas pesada y ligera de 3D6. En particular, los dominios variables de anticuerpos humanos cuyas secuencias de marco conservado presentaban un alto grado de identidad de secuencia con las regiones de marco conservado de VL y VH murinas se identificaron por consulta de la Base de Datos de Kabat usando NCBI BLAST (accesible para el público por el servidor de internet del NCBI de los Institutos Nacionales de la Salud) con las secuencias de marco conservado murinas respectivas.

Se eligieron dos secuencias candidatas como secuenciasceptoras basándose en los siguientes criterios: (1) homología con la secuencia objeto; (2) compartir estructuras canónicas de CDR con la secuencia donadora; y (3) no contener ningún resto de aminoácido raro en las

regiones de marco conservados. La secuencia aceptora seleccionada para VL es el Número de ID de Kabat (KABID) 019230 (Genbank, Nº de Acceso S40342), y para VH es KABID 045919 (Genbank, Nº de Acceso AF115110). Las primeras versiones del anticuerpo 3D6 humanizado utilizan estas secuencias de anticuerpo aceptor seleccionadas.

5 *Sustitución de Restos De aminoácidos.* Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden regiones de marco conservado variables sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina humana (inmunoglobulina aceptora) y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina de ratón (inmunoglobulina donadora) denominada 3D6. Habiendo
10 identificado las regiones determinantes de complementariedad de 3D6 e inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa fue determinar si restos, si los hay, de estos componentes se sustituyen para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. Se usaron los criterios descritos anteriormente para seleccionar restos para la sustitución.

15 Las Figuras 1 y 2 representan alineamientos de la VL y VH de 3D6 murino original, respectivamente, con la versión 1 respectiva de la secuencia humanizada, la secuencia aceptora de marco conservado humana correspondiente y, por último, la secuencia de región V de línea germinal humana que muestra la mayor homología con la secuencia aceptora de marco conservado humana. Los restos sombreados indican aminoácidos canónicos (relleno
20 sólido), vernier (perfilado de trazos), empaquetamiento (negrita) y aminoácidos raros (negrita y cursiva) y se indican en la figura. Los asteriscos indican restos retromutados a restos murinos en la secuencia de marco conservado aceptora humana, y las regiones CDR se muestran con una línea por encima. En la Tabla 12 se presenta un resumen de los cambios incorporados en la versión 1 de la VH y VL de 3D6 humanizado.

25

30

35

Tabla 12. Resumen de cambios en 3D6.v1 humanizado

Cambios	VL (112 restos)	VH (119 restos)
Hu->Mu: Marco conservado	4/112	3/119 (1 canon, 1 empaquetamiento)
CDR1	6/16	3/5
CDR2	4/7	7/14
CDR3	5/8	4/10
Hu->Mu	19/112 (17%)	17/119 (14%)
Mu->Hu: Marco conservado	13/112	4/119
Notas de retromutación	1. I2V que es una posición canónica. 2. Y36L que es un resto de empaquetamiento y también está bajo las CDR 3. L46R que es un resto de empaquetamiento y está por debajo de las CDR	4. S49A Vernier/por debajo de las CDRS. 5. A93V que es un resto de empaquetamiento y de zona vernier 6. D94R que es un resto canónico
Notas de aceptor	7. KABID 019230/Genbank Nº Acc. S40342 8. Hu κ LC subgrupo II 9. CDR del mismo grupo de estructura canónica que el donante (m3D6) L1 = clase 4 1 L2 = clase L3 = clase 1 10. Especificidad desconocida	11. KABID045919/Genbank Nº Acc AF115110 12. Hu HC subgrupo III 13. CDR del mismo grupo de estructura canónica que el donante (m3D6) H1 = clase 1 H2 = clase 3 14. Reconoce el polisacárido capsular de <i>Neisseria meningitidis</i>
Línea Germinal de aceptor	15. VH3-23	16. A3 y A19

Las Tablas 13 y 14 exponen las claves de numeración de Kabat para las diversas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Tabla 13: Clave para la Numeración de Kabat para la Cadena Ligera

KAB Nº	Nº	TIPO	VL de 3D6 de ratón	3D6VL HUM	KABID 019230	Línea Germinal	Comentario
						A19	
1	1	FR1	Y	Y	D	D	Ratón raro, puede contactar
2	2		V	V	I	I	CDR
							Canónico/contacto de CDR
3	3		V	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	
5	5		T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	
7	7		T	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	
9	9		L	L	L	L	
10	10		T	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	
12	12		S	P	P	P	
13	13		V	V	V	V	
14	14		T	T	T	T	
15	15		I	P	P	P	
16	16		G	G	G	G	
17	17		Q	E	E	E	
18	18		P	P	P	P	
19	19		A	A	A	A	
20	20		S	S	S	S	
21	21		I	I	I	I	
22	22		S	S	S	S	
23	23		C	C	C	C	
24	24	CDR1	K	K	R	R	
25	25		S	S	S	S	
26	26		S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	
27A	28		S	S	S	S	
27B	29		L	L	L	L	

27C	30	L	L	L	L
27D	31	D	D	H	H
27E	32	S	S	S	S
28	33	D	D	N	N
29	34	G	G	G	G
30	35	K	K	Y	Y
31	36	T	T	N	N
32	37	Y	Y	Y	Y
33	38	L	L	L	L
34	39	N	N	D	D

35	40	FR2	W	W	W	W
36	41		L	L	Y	Y
37	42		L	L	L	L
38	43		Q	Q	Q	Q
39	44		R	K	K	K
40	45		P	P	P	P
41	46		G	G	G	G
42	47		Q	Q	Q	Q
43	48		S	S	S	S
44	49		P	P	P	P
45	50		K	Q	Q	Q
46	51		R	R	L	L
47	52		L	L	L	L
48	53		I	I	I	I
49	54		Y	Y	Y	Y

Resto de empaquetamiento

Resto de empaquetamiento

50	55	CDR2	L	L	L	L
51	56		V	V	G	G
52	57		S	S	S	S
53	58		K	K	N	N
54	59		L	L	R	R
55	60		D	D	A	A
56	61		S	S	S	S
57	62	FR3	G	G	G	G

58	63	V	V	V	V
59	64	P	P	P	P
60	65	D	D	D	D
61	66	R	R	R	R
62	67	F	F	F	F
63	68	T	S	S	S
64	69	G	G	G	G
65	70	S	S	S	S
66	71	G	G	G	G
67	72	S	S	S	S
68	73	G	G	G	G
69	74	T	T	T	T
70	75	D	D	D	D
71	76	F	F	F	F
72	77	T	T	T	T
73	78	L	L	L	L
74	79	K	K	K	K
75	80	I	I	I	I
76	81	S	S	S	S
77	82	R	R	R	R
78	83	I	V	V	V
79	84	E	E	E	E
80	85	A	A	A	A
81	86	E	E	E	E
82	87	D	D	D	D
83	88	L	V	V	V
84	89	G	G	G	G
85	90	L	V	V	V
86	91	Y	Y	Y	Y
87	92	Y	Y	Y	Y
88	93	C	C	C	C
89	94	CDR3 W	W	M	M
90	95	Q	Q	Q	Q
91	96	G	G	A	A

92	97		T	T	L	L
93	98		H	H	Q	Q
94	99		F	F	T	T
95	100		P	P	P	P
96	101		R	R	R	
97	102		T	T	T	
98	103	FR4	F	F	F	
99	104		G	G	G	
100	105		G	Q	Q	
101	106		G	G	G	
102	107		T	T	T	
103	108		K	K	K	
104	109		L	V	V	
105	110		E	E	E	
106	111		I	I	I	
106A	112		K	K	K	

Tabla 14. Clave para la Numeración de Kabat para la Cadena Pesada

KAB Nº	Nº	TIPO	VH de de ratón	3D6 VH 3D6 HUM	de KABID 045919	Línea germinal VH3-23	Comentario
1	1	FR1	E	E	E	E	
2	2		V	V	V	V	
3	3		K	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L	L	
5	5		V	L	L	L	
6	6		E	E	E	E	
7	7		S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	
9	9		G	G	G	G	
10	10		G	G	G	G	
11	11		L	L	L	L	
12	12		V	V	V	V	
13	13		K	Q	Q	Q	
14	14		P	P	P	P	

15	15		G	G	G	G	
16	16		A	G	G	G	
17	17		S	S	S	S	
18	18		L	L	L	L	
19	19		K	R	R	R	
20	20		L	L	L	L	
21	21		S	S	S	S	
22	22		C	C	C	C	
23	23		A	A	A	A	
24	24		A	A	A	A	
25	25		S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	
27	27		F	F	F	F	
28	28		T	T	T	T	
29	29		F	F	F	F	
30	30		S	S	S	S	
31	31	CDR1	N	N	S	S	
32	32		Y	Y	Y	Y	
33	33		G	G	A	A	
34	34		M	M	V	M	
35	35		S	S	S	S	
36	36	FR2	W	W	W	W	
37	37		V	V	V	V	
38	38		R	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q	Q	
40	40		N	A	A	A	Ratón raro, reemplazo con Hum
41	41		S	P	P	P	
42	42		D	G	G	G	Ratón raro, reemplazo con Hum
43	43		K	K	K	K	
44	44		R	G	G	G	
45	45		L	L	L	L	
46	46		E	E	E	E	

84

47	47		W	W	W	W	
48	48		V	V	V	V	
49	49		A	A	S	S	contacto CDR/venier
50	50	CDR2	S	S	A	A	
51	51		I	I	I	I	
52	52		R	R	S	S	
52A	53		S	S	G	G	
53	54		G	G	S	S	
54	55		G	G	G	G	
55	56		G	G	G	G	
56	57		R	R	S	S	
57	58		T	T	T	T	
58	59		Y	Y	Y	Y	
59	60		Y	Y	Y	Y	
60	61		S	S	A	A	
61	62		D	D	D	D	
62	63		N	N	S	S	
63	64		V	V	V	V	
64	65		K	K	K	K	
65	66		G	G	G	G	
66	67	FR3	R	R	R	R	
67	68		F	F	F	F	
68	69		T	T	T	T	
69	70		I	I	I	I	
70	71		S	S	S	S	
71	72		R	R	R	R	
72	73		E	D	D	D	
73	74		N	N	N	N	
74	75		A	A	A	S	
75	76		K	K	K	K	
76	77		N	N	N	N	
77	78		T	S	S	T	
78	79		L	L	L	L	
79	80		Y	Y	Y	Y	

85

80	81	L	L	L	L
81	82	Q	Q	Q	Q
82	83	M	M	M	M
82A	84	S	N	N	N
82B	85	S	S	S	S
82C	86	L	L	L	L
83	87	K	R	R	R
84	88	S	A	A	A
85	89	E	E	E	E
86	90	D	D	D	D
87	91	T	T	T	T
88	92	A	A	A	A
89	93	L	L	L	V
90	94	Y	Y	Y	Y
91	95	Y	Y	Y	Y
92	96	C	C	C	C
93	97	V	V	A	A

Resto de
empaquetamiento, uso
ratón

94	98	R	R	K	K
95	99	CDR3 Y	Y	D	
96	100	D	D	N	
97	101	H	H	Y	
98	102	Y	Y	D	
99	103	S	S	F	
100	104	G	G	W	
100A	105	S	S	S	
100B	106	S	S	G	
100C	107	-	-	T	
100D	108	-	-	F	
101	109	D	D	D	
102	110	Y	Y	Y	
103	111	FR4 W	W	W	
104	112	G	G	G	
105	113	Q	Q	Q	

Canónico, uso ratón

106	114	G	G	G
107	115	T	T	T
108	116	T	L	L
109	117	V	V	V
110	118	T	T	T
111	119	V	V	V
112	120	S	S	S
113	121	S	S	S

Los anticuerpos humanizados preferentemente presentan una afinidad de unión específica por A β de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M $^{-1}$. Normalmente, el límite superior de la afinidad de unión de los anticuerpo humanizados por A β está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco con respecto al de 3D6 (es decir, $\sim 10^9$ M $^{-1}$). Con frecuencia, el límite inferior de la afinidad de unión también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco con respecto al de 3D6.

Ensamblaje y Expresión de VH y VL de 3D6 Humanizado, Versión 1. En resumen, para cada región V se sintetizaron 4 oligonucleótidos solapantes monocatenarios grandes. Además, se sintetizaron 4 cebadores de PCR cortos para cada región V para facilitar adicionalmente el ensamblaje de la región V particular. Las secuencias de ADN de los oligonucleótidos empleados para este fin se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Oligonucleótidos de ADN

ADN N°	TAMAÑO	¿Codificante?	Secuencia	Comentarios
4060	136	Sí	tccgc aagct tgccg ccacc ATGGA CATGC GCGTG CCCGC CCAGC TGCTG GGCCT GCTGA TGCTG TGGGT GTCCG GCTCC TCCGG CTACG TGGTG ATGAC CCAGT CCCCC CTGTC CCTGC CCGTG ACCCC CGGCG A (SEC ID N°: 17)	VL-A de 3D6 hum
4061	131	No	CTGGG GGGAC TGGCC GGGCT TCTGC AGCAG CCAGT TCAGG TAGGT CTTGC CGTCG GAGTC CAGCA GGGAC TGGGA GGA CT TGCAG GAGAT GGAGG CGGGC TCGCC GGGGG TCACG GGCAG GGACA GGGGG G (SEC ID N°: 18)	VL-B de 3D6 hum

4062	146	Sí	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AAGCC CGGCC AGTCC CCCCC GCGCC TGATC TACCT GGTGT CCAAG CTGGA CTCCG GCGTG CCCGA CCGCT TCTCC GGCTC CGGCT CCGGC ACCGA CTTCA CCCTG AAGAT CTCCC GCGTG GAGGC c (SEC ID N°: 19)	VL-C de 3D6 hum
4063	142	No	aattc tagga tccac tcacg CTTGA TCTCC ACCTT GGTGC CCTGG CCGAA GGTGC GGGGG AAGTG GGTGC CCTGC CAGCA GTAGT ACACG CCCAC GTCCT CGGCC TCCAC GCGGG AGATC TTCAG GGTGA AGTCG GTGCC GG (SEC ID N°: 20)	VL-D de 3D6 hum
4064	16	No	CTGGG GGGAC TGGCC G (SEC ID N°: 21)	retro A+B de VL de 3D6 hum %A+T = 18,75 [3]; %C+G = 81,2 [13] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 66,96
4065	22	Sí	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AA (SEC ID N°: 22)	directo C+D de VL de 3D6 hum %A+T = 45,45 [10]; %C+G = 54,55 [12] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 64,54
4066	138	Sí	acaga aagct tgccg ccacc ATGGA GTTTG GGCTG AGCTG GCTTT TTCTT GTGGC TATTT TAAAA GGTGT CCAGT GTGAG GTGCA GCTGC TGGAG TCCGG CGGCG GCCTG GTGCA GCCCG GCGGC TCCCT GCGCC TGT (SEC ID N°: 23)	VH-A de 3D6 hum
4067	135	No	GCCGC CGGAG CGGAT GGAGG CCACC CACTC CAGGC CCTTG CCGGG GGCCT GCGGC ACCCA GGACA TGCCG TAGTT GGAGA AGGTG AAGCC GGAGG CGGCG CAGGA CAGGC GCAGG GAGCC GCCGG GCTGC ACCAG (SEC ID N°: 24)	VH-B de 3D6 hum
4068	142	Sí	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT CCGCT CCGGC GGCGG CCGCA CCTAC TACTC CGACA ACGTG AAGGG CCGCT TCACC ATCTC CCGCG ACAAC GCCAA GAACT CCCTG TACCT GCAGA TGAAC TCCCT GCGCG CCGAG GACAC CG (SEC ID N°: 25)	VH-C de 3D6 hum

4069	144	No	ctgca aggat ccact caccG GAGGA CACGG TCACC AGGGT GCCCT GGCCC CAGTA GTCGG AGGAG CCGGA GTAGT GGTCG TAGCG CACGC AGTAG TACAG GGCGG TGTCC TCGGC GCGCA GGGAG TTCAT CTGCA GGTAC AGGG (SEC ID N°: 26)	VH-D de 3D6 hum
4070	16	No	GCCGC CGGAG CGGAT G (SEC ID N°: 27)	retro A+B de VH de 3D6 hum %A+T = 18,75 [3]; %C+G = 81,25 [13] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 66,96
4071	20	Sí	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT (SEC ID N°: 28)	directo C+D de VH de 3D6 hum %A+T = 35,00 [7]; %C+G = 65,00 [13] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 66,55
4072	19	Sí	tcc gca agc ttg ccg cca c (SEC ID N°: 29)	directo A+B de VL de 3D6 hum %A+T = 31,58 [6]; %C+G = 68,42 [13] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 66,64
4073	29	No	aat tct agg atc cac tca cgC TTG ATC TC (SEC ID N°: 30)	retro C+D de VL de 3D6 hum %A+T = 55,17 [16]; %C+G = 44,83 [13] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 66,04
4074	23	Sí	aca gaa agc ttg ccg cca ccA TG (SEC ID N°: 31)	directo A+B de VH de 3D6 hum %A+T = 43,48 [10]; %C+G = 56,52 [13] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 66,33
4075	22	No	ctg caa gga tcc act cac cGG A (SEC ID N°: 32)	retro C+D de VH de 3D6 hum %A+T = 40,91 [9]; %C+G = 59,09 [13] Davis, Botstein, Roth Temperatura de Fusión C. 66,40

La cadena ligera humanizada se ensambló usando PCR. El análisis de la secuencia de ADN de más de dos docenas de clones reveló mutaciones puntuales dispersas y deleciones a lo largo de toda la región VL con respecto a la secuencia esperada. En análisis de las secuencias indicó que el clon 2.3 era susceptible de reparación de 2 deleciones de un solo nucleótido poco separadas en la región amino-terminal. Por lo tanto, se realizó mutagénesis dirigida en el clon pCRShum3D6v12.3 usando oligonucleótidos para introducir los dos nucleótidos delecionados, y la reparación de las mutaciones puntuales se confirmó por análisis de la secuencia de ADN, y el inserto de VL se clonó en el vector de expresión de cadena ligera pCMV-cK.

El ensamblaje de VH humanizadas usando procedimientos basados en PCR dio como resultado clones con deleciones grandes en la mitad 5' de la secuencia. Los esfuerzos adicionales para optimizar las condiciones de PCR tuvieron un éxito parcial. Los clones ensamblados por medio de las condiciones de PCR optimizadas aún tenían deleciones de 10-20 nt en la región que se localiza en el solapamiento de los fragmentos A+B. Por consiguiente, se empleó una estrategia alternativa para el ensamblaje de VH utilizando extensión solapante mediada por la ADN polimerasa (T4, Klenow, y Sequenase), seguida de ADN ligasa de T4 para unir covalentemente los extremos solapantes. El análisis de la secuencia de ADN de una subserie de los clones resultantes del ensamblaje de VH usando la última estrategia reveló mutaciones puntuales dispersas y deleciones entre los clones. El análisis de más de dos docenas de clones reveló esencialmente el mismo patrón que se ilustra para los clones. Los resultados similares observados después del ensamblaje de primer paso de clones VH y VL sugiere que los errores en la secuencia de ADN observados se debieron a errores en el sintetizador automático durante la síntesis de los ADN largos empleados para el ensamblaje.

Se seleccionó el clon de VH humanizado 2.7 para la reparación mediada por mutagénesis dirigida de las 3 deleciones de nucleótidos que se observó que contenía.

Ejemplo XIII: Caracterización de Anticuerpo 3D6v2 Humanizado

Se creó una segunda versión de 3D6 humanizado que tenía cada una de las sustituciones indicadas para la versión 1, excepto la sustitución D→Y en el resto 1. La sustitución en este resto se realizó en la versión 1 porque el resto se identificó como un resto de interacción con CDR. Sin embargo, la sustitución delecionó un resto que era raro para inmunoglobulinas humanas en esa posición. Por lo tanto, se creó una versión sin la sustitución. Además, se sustituyeron restos que no eran de la línea germinal en las regiones de marco conservado de cadena pesada con restos de la línea germinal, particularmente H74 = S, H77 = T y H89 = V. La numeración de Kabat para las cadenas pesada y ligera de la versión 2 es la misma que se representa en las Tablas 13 y 14 respectivamente, con la excepción de que el

resto 1 de la cadena ligera de la versión 2 es asp (D), el resto 74 de la cadena pesada es ser (S), el resto 77 de la cadena pesada es thr (T) y el resto 89 de la cadena pesada es val (V). La secuencia de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera de la versión 1 de 3D6 humanizado se expone como SEC ID N°: 34 y 36, respectivamente. La secuencia nucleótidos de las cadenas pesada y ligera de la versión 2 de 3D6 humanizado se exponen como SEC ID N°: 35 y 37, respectivamente.

Ejemplo IX: Ensayo Funcional de Anticuerpos 3D6 Humanizados

Unión de 3D6v1 humanizado a A β agregado. Se realizó un ensayo funcional de 3D6v1 humanizado usando medio acondicionado de células COS transfectadas de forma transitoria. Las células se transfectaron con anticuerpo totalmente quimérico, una mezcla de cadena pesada quimérica + cadena ligera humanizada, o cadena ligera quimérica + cadena pesada humanizada, y por último anticuerpo totalmente humanizado. El medio acondicionado se ensayó con respecto a la unión a A β 1-42 agregado por ensayo ELISA. El anticuerpo humanizado mostró buena actividad dentro del error experimental, y presentó propiedades de unión indistinguibles de la muestra de referencia de 3D6 quimérico. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16:

ng/ml	Quimérico	VH hu/ VLCh	VHCh/ VLHu	VH Hu/ VLHu
690	0,83	0,811	0,867	0,895
600				
260			0,774	
230				
200	0,675	0,648		0,81
190				
87			0,594	
77				0,689
67	0,45	0,438		
63				
29			0,381	
25				0,496
22	0,251			
21				
9,6			0,198	
8,5				
7,4				0,278

7		0,232		
3,2	0,129			
2,3		0,124		

Para comparar las afinidades de unión de los anticuerpos 3D6v1 y 3D6v2 humanizados, se realizó un análisis ELISA usando A β agregado como antígeno. Los resultados demuestran que tanto 3D6v1 (H1L1) como 3D6v2 (H2L2) tienen propiedades de unión a A β casi idénticas (Figura 5).

5 *Análisis de NET de reemplazo (rNET) de h3D6v2.* El ensayo de mapa de epítipo de rNET proporciona información sobre la contribución de restos individuales dentro del epítipo a la actividad de unión global del anticuerpo. El análisis de rNET usa análogos de péptidos sustituidos individuales sistemáticos sintetizados. Se determina la unión de un anticuerpo a ensayar frente al péptido nativo (antígeno nativo) y frente a 19 péptidos “con sustituciones
10 individuales” alternativos, estando sustituido cada péptido en una primera posición con uno de 19 aminoácidos no nativos para esa posición. Se genera un perfil que refleja el efecto de la sustitución en esa posición con los diversos restos no nativos. De forma similar, se generan perfiles en posiciones sucesivas a lo largo del péptido antigénico. El perfil combinado, o mapa de epítopes (que refleja la sustitución en cada posición con los 19 restos no nativos) después
15 puede compararse con un mapa generado de forma similar para un segundo anticuerpo. Los mapas substancialmente similares o idénticos indican que los anticuerpos que se están comparando tienen la misma especificidad de epítipo o una especificidad de epítipo similar.

Este análisis se realizó para 3D6 y 3D6 humanizado, versión 2. Los anticuerpos se ensayaron con respecto a la unión al péptido A β nativo DAEFRHDSGY (SEC ID N°: 33). Los
20 restos 1-8 se sustituyeron sistemáticamente con cada uno de los 19 restos no nativos para esa posición. Por consiguiente, se generaron mapas para 3D6 y h3D6v2. Los resultados se presentan en forma de tabla en la Tabla 17.

Tabla 17: A β : mapeo de Epítipo de Net de reemplazo (rNET) de 3D6 de tipo silvestre y 3D6 humanizado.

	3D6 de tipo silvestre	3D6 humanizado		3D6 de tipo silvestre	3D6 humanizado
Sustitución	[DO]	[DO]	Sustitución	[DO]	[DO]
Resto 1 = A	0,464	0,643	Resto 5 = A	0,275	0,435
C	0,450	0,628	C	0,359	0,635
D	0,577	0,692	D	0,080	0,163
E	0,576	0,700	E	0,115	0,187

F	0,034	0,062	F	0,439	0,569
G	0,569	0,738	G	0,485	0,679
H	0,054	0,117	H	0,577	0,680
I	0,048	0,118	I	0,510	0,671
K	0,033	0,057	K	0,573	0,693
L	0,073	0,148	L	0,517	0,691
M	0,039	0,072	M	0,418	0,611
N	0,587	0,757	N	0,476	0,655
P	0,069	0,144	P	0,093	0,198
Q	0,441	0,689	Q	0,388	0,565
R	0,056	0,155	R	0,613	0,702
S	0,569	0,762	S	0,487	0,633
T	0,450	0,702	T	0,530	0,639
V	0,057	0,190	V	0,493	0,562
W	0,031	0,070	W	0,393	0,461
Y	0,341	0,498	Y	0,278	0,230
Resto 2 = A	0,548	0,698	Resto 6 = A	0,587	0,707
C	0,553	0,694	C	0,585	0,703
D	0,119	0,222	D	0,584	0,701
E	0,563	0,702	E	0,579	0,702
F	0,577	0,717	F	0,586	0,704
G	0,527	0,720	G	0,592	0,709
H	0,534	0,741	H	0,596	0,688
I	0,522	0,722	I	0,602	0,708
K	0,548	0,722	K	0,585	0,691
L	0,482	0,705	L	0,584	0,688
M	0,535	0,705	M	0,583	0,687
N	0,525	0,735	N	0,580	0,686
P	0,445	0,707	P	0,587	0,705
Q	0,567	0,756	Q	0,570	0,695
R	0,562	0,719	R	0,576	0,686
S	0,587	0,705	S	0,573	0,689
T	0,552	0,712	T	0,573	0,700
V	0,550	0,702	V	0,588	0,715

W	0,553	0,701	W	0,576	0,696	
Y	0,547	0,704	Y	0,595	0,708	
Resto 3 = A	0,038	0,061	Resto 7 = A	0,580	0,688	
	C	0,222	C	0,559	0,676	
	D	0,019	D	0,573	0,681	
	E	0,542	E	0,565	0,677	
	F	0,034	F	0,546	0,668	
	G	0,016	G	0,562	0,679	
	H	0,016	H	0,557	0,675	
	I	0,019	I	0,552	0,681	
	K	0,053	K	0,565	0,685	
	L	0,019	L	0,566	0,701	
	M	0,019	M	0,562	0,697	
	N	0,024	N	0,573	0,688	
	P	0,017	P	0,582	0,678	
	Q	0,153	Q	0,563	0,679	
	R	0,015	R	0,551	0,677	
	S	0,016	S	0,563	0,674	
	T	0,015	T	0,560	0,685	
	V	0,016	V	0,563	0,687	
	W	0,149	0,304	W	0,547	0,685
	Y	0,016	0,020	Y	0,560	0,682
Resto 4 = A	0,016	0,020	Resto 8 = A	0,573	0,687	
	C	0,020	C	0,583	0,700	
	D	0,017	D	0,586	0,697	
	E	0,016	E	0,601	0,701	
	F	0,557	F	0,586	0,687	
	G	0,016	G	0,569	0,681	
	H	0,470	H	0,559	0,683	
	I	0,119	I	0,568	0,686	
	K	0,015	K	0,557	0,698	
	L	0,559	L	0,570	0,686	
	M	0,549	M	0,571	0,693	
	N	0,085	N	0,573	0,700	

P	0,030	0,056	P	0,574	0,694
Q	0,065	0,110	Q	0,590	0,703
R	0,016	0,019	R	0,589	0,699
S	0,026	0,031	S	0,599	0,719
T	0,016	0,021	T	0,586	0,689
V	0,213	0,494	V	0,578	0,688
W	0,291	0,568	W	0,567	0,687
Y	0,529	0,730	Y	0,574	0,680

Notablemente, los perfiles son prácticamente idénticos para 3D6 y h3D6v2 cuando se miran las sustituciones en cada posición (es decir, los valores fluctúan de una manera idéntica cuando se comparan los datos en la columna 1 (3D6) frente a la columna 2 (h3D6v2)). Estos datos demuestran que se conserva la especificidad de h3D6v2, ya que el mapa de epítipo de rNET de h3D6v2 es prácticamente idéntico a m3D6 usando los restos de A β 1-4 y 5-8.

La inmunohistoquímica de secciones cerebrales de PDAPP demuestra la especificidad del anticuerpo h3D6v1. El anticuerpo 3D6v1 humanizado reconoció a A β en secciones cerebrales preparadas en criostato procedentes de ratones PDAPP. Tanto 3D6v1 humanizado como PK1614 se unían a placas de PDAPP con la misma forma de respuesta a la dosis, como se mide por la cantidad de fluorescencia (cuantificada en píxeles) por portaobjetos frente a la cantidad de anticuerpo usado para teñir el tejido (Figura 6). En este experimento se usaron anticuerpos secundarios anti-humanos idénticos. La obtención de secciones, la tinción y los procedimientos de obtención de imágenes se describieron previamente. En experimentos idénticos, el análisis de imágenes de la tinción por h3D6v2 en secciones de cerebro PDAPP y AD reveló que h3D6v2 reconoce las placas de A β de una forma similar a 3D6v1 (por ejemplo, placas muy decoradas).

Análisis de unión competitiva de h3D6. La capacidad de anticuerpos h3D6v1 y v2 de competir con 3D6 murino se midió por ELISA usando un anticuerpo 3D6 biotinilado. El análisis de unión competitiva reveló que h3D6v1, h3D6v2 y PK1614 quimérico pueden competir con m3D6 por la unión a A β (Figura 7). h3D6v1 y h3D6v2 fueron idénticos en su capacidad de competir con 3D6 por A β . El anticuerpo 10D5 se usó como control negativo, ya que tiene un epítipo de unión diferente que 3D6. El análisis BIAcore también reveló una alta afinidad de h3D6v1 y h3D6v2 por A β (Tabla 18).

Tabla 18: Mediciones de Afinidad de Anticuerpos contra A β Usando Tecnología BIAcore

Anticuerpo	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	Kd (nM)
3D6 Mu	4,06E +05	3,57E-04	0,88
3D6 Quimérico	4,58E+05	3,86E-04	0,84
3D6v1 Hu	1,85E+05	3,82E-04	2,06
3D6v2 Hu	1,70E+05	3,78E-04	2,24

En comparación con 3D6, que tiene una Kd de 0,88 nM, tanto h3D6v1 como h3D6v2 tenían una afinidad de unión de aproximadamente 2 a 3 veces menor, medida a 2,06 nM y 2,24 nM, para h3D6v1 y h3D6v2, respectivamente. El ensayo de unión competitiva del ELISA reveló una afinidad de unión aproximadamente 6 veces menor para h3D6v1 y h3D6v2. Típicamente, los anticuerpos humanizados tienen una pérdida de aproximadamente 3 a 4 veces en la afinidad de unión en comparación con sus homólogos murinos. Por lo tanto, una pérdida de aproximadamente 3 veces (media de resultados del ELISA y BIAcore) para h3D6v1 y h3D6v2 está dentro del intervalo aceptable.

Ensayo ex vivo usando anticuerpo h3D6v2. La capacidad de h3D6v2 de estimular células de la microglía se ensayó por medio de un ensayo de fagocitosis *ex vivo* (Figura 8). H3D6v2 era tan eficaz como 3D6 quimérico en la inducción de la fagocitosis de agregados de A β de tejido cerebral de ratón PDAPP. Se usó IgG como control negativo en este experimento porque es incapaz de unirse a A β y por lo tanto no puede inducir la fagocitosis.

Localización en cerebro in vivo de h3D6. Se inyectaron h3D6v2 marcado con ^{125}I , m3D6 y anticuerpo DAE13 por vía intravenosa en 14 ratones PDAPP individuales en experimentos separados. Los ratones se sacrificaron después del Día 7 y se sometieron a perfusión para un análisis adicional. Sus regiones cerebrales se diseccionaron y se midió la actividad de ^{125}I en regiones cerebrales específicas. La actividad del radiomarcador en el cerebro se comparó con la actividad en muestras de suero. Los resultados se exponen en la Tablas 19 y 20 para regiones de suero y cerebro, respectivamente.

Tabla 19

m3D6	DAE13	Hu3D6
30389,1	17463,9	40963,8
12171	13200,6	24202,2
3418,2	36284,7	12472,4
18678,9	421,3	33851,8

27241	19702	27187,3
26398,8	24855,8	29016,9
27924,8	29287,4	33830,7
12008,4	12733,1	26734,9
29487,8	27722,5	30144,5
25498,6	30460,7	35126,9
9652	23320,1	28414,8
24599,3	7119,1	16956,1
29240	28093,5	18190,7
11922,7	24659,7	25671,4
17443,1	26748,9	

Tabla 20

m3D6			DAE13			Hu3D6 (H2L2)		
cere	cort	hip	cere	cort	hip	cere	cort	hip
1991,9	1201,1	4024	1277,5	2522,9	5711,9	2424,6	3759,4	11622
238,9	746,1	2523	502,5	2123,5	6965,8	1509,8	2274,9	7018,2
645,9	603	1241,1	2325	3528,2	7801,6	500	2265,9	5316,3
1000	2508,2	4644,2	232,7	849,8	1891,9	2736,2	5703,7	10395,5
1266,9	3737,9	7975,8	891,6	2621	8245,2	1192,2	3188	10170
1422	2398,7	7731,1	1102,6	2087,5	7292,3	2269,4	3481,4	9621,6
1700,4	2154,4	7124,1	1650,6	3488,4	10284,8	1526,7	3028	8331,3
542,5	812,4	2456,8	712,9	2318,5	6643,3	1538,1	4194,1	11244,8
1309	3010,5	8693,5	1172,9	1953,6	7363	1245,7	1699,4	6831,2
1372,2	997,5	2425,4	1067,9	3697,2	12280,7	2708,8	2789	7887,4
778,6	1291,9	5654,4	1952,2	2120,7	6412,7	2251,3	3897,5	11121,5
1199,3	1683,4	4887,3	1005,2	1852,5	5121,4	1529,6	1772,2	7986,9
1021,8	3234,5	8036,2	961,5	3382,9	8473,1	644,1	1663,4	5056,5
742,1	1056,7	3405,2	852,3	1943,2	6717,4	1516,4	1620,6	9888
1273,7	1320,8	4262,6	997,5	3065,7	10213,1			

Los datos muestran que h3D6v2 se localizaba en el cerebro y se concentraba particularmente en la región del hipocampo en la que se sabe que se agrega A β . Los recuentos cerebrales para m3D6 y DAE13 fueron comparables a h3D6v2. Los tres anticuerpos podían atravesar la barrera hematoencefálica como se demuestra por la unión a placas de A β *in vivo*.

Ejemplo X. Clonación y Secuenciación de Regiones Variables de 10D5 de Ratón

Clonación y Análisis de Secuencia de VH de 10D5. Se clonaron las regiones VH y VL de 10D5 de células de hibridoma por RT-PCR usando procedimientos 5' RACE. La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 13) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 14) procedentes de dos clones de ADNc independientes que codifican el supuesto dominio VL de 10D5 se exponen en la Tabla 21 y en la Figura 9. La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 15) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 16) procedentes de dos clones de ADNc independientes que codificaban el supuesto dominio VH de 10D5, se exponen en la Tabla 22 y la Figura 10. Las secuencias de VL y VH de 10D5 cumplen los criterios de regiones V funcionales en la medida en que contienen una ORF contigua desde la metionina iniciadora a la región C, y comparten restos conservados característicos de genes de región V de inmunoglobulina.

Tabla 21: Secuencia de ADN de VL de 10D5 de Ratón

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTACTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGA
 TGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA
 TCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTATACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG
 TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATT
 TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGA
 TCAAGAAAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTT
 CCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGGAA (SEC ID N°: 13)

*Péptido líder subrayado

Tabla 22: Secuencia de ADN de VH de 10D5 de Ratón

ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCCTGTCCCA
 GGCTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGAATATTGCAGTCTCCAGACCCTCAGTCTGA
 CTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCAGTGAAGTCTGTTGATGGGAGTGAGCTGGATTCTG
 CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCG
 CTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAAGCAGG
 TATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACCCTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGTTTCA
 AGGCCATTACTCCGGTACTAGTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
 CACCGTCTCCTCA (SEC ID N°: 15)

*Péptido líder subrayado

Ejemplo XI: Eficacia del mAb 3D6 sobre diversas variables de valoración neuropatológicas en ratones PDAPP

Este Ejemplo describe la eficacia del mAb 3D6 murino sobre diversas variables de valoración neuropatológicas. Se realiza una comparación entre la inmunización pasiva con 3D6

(a dosis variables) y la inmunización activa con un péptido A β .

Inmunizaciones

Se inmunizaron pasivamente ratones PDAPP con mAb 3D6 a tres dosis diferentes, 10 mg/kg, 1 mg/kg y 10 mg/kg una vez al mes (1 x 4). Como controles sirvieron un anticuerpo IgG γ 2a no relacionado (TY 11/15) e inyecciones de PBS. La inmunización activa con péptido A β sirvió como comparación. En cada grupo se analizaron entre 20 y 35 animales.

Las variables de valoración neuropatológicas ensayadas incluyen carga amiloide y carga neurítica.

Carga amiloide

El grado de corteza frontal ocupada por depósitos amiloides se determinó por inmunotinción con 3D6 seguido por análisis cuantitativo de imágenes. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 6. Cada una de las inmunoterapias condujo a una reducción significativa de la carga amiloide.

Carga neurítica

Se determinó la carga neurítica después de la inmunización pasiva con 3D6 en ratones PDAPP por inmunotinción de secciones cerebrales con anticuerpo anti-APP 8E5 seguido de análisis de imágenes cuantitativo. La distrofia neurítica se indica por la aparición de neuritas distróficas (por ejemplo, neuritas con un aspecto globular) localizadas en las proximidades inmediatas de placas de amiloide. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 7. 3D6 (isotipo IgG γ 2a, que reconoce a A β 1-5) no reducía significativamente la carga neurítica en comparación con la inmunización activa con el péptido A β . Previamente, se había observado que 10D5 (isotipo de IgG γ 1 que reconoce a A β 3-7) no podía reducir significativamente la carga neurítica.

Tabla 23: Carga Amiloide de Corteza Frontal

	PBS	TY 11/15	3D6,10 mg/kg	3D6,1 mg/kg	3D6, 10 mg/kg/ 4 semanas	Activo
N	31	30	29	31	32	24
Mediana (%AB)	15,182297	13,303288	0,865671	2,286513	1,470956	2,162772
Intervalo	0,160- 31,961	0-61,706	0-7,064	0,077- 63,362	0-10,688	0-30,715
Valor de p (*M-W)		0,9425 ns	***0,0001	***0, <,0001	*** <0,0001	***0,0004
% de cambio	N/A	12%	94%	85%	90%	86%

Tabla 24: Carga Neurítica de la Corteza Frontal

	PBS	TY 11/15	3D6, 10 mg/kg	3D6, 1 mg/kg	3D6, 10 mg/kg/4 semanas	Activo
N	31	30	29	31	32	24
Mediana (%NB)	0,3946	0,3958	0,4681	0,3649	0,4228	0,2344
Intervalo	0-1,3828	0-2,6800	0-1,3098	0-1,5760	0-1,8215	0-1,1942
Valor de p (*M-W)		0,8967 ns	0,9587 ns	0,6986 ns	>0,9999	***0,0381
% de cambio		0%	0%	7%	0%	41%

La caracterización de diversas variables de valoración neuropatológicas en el modelo de ratón PDAPP de enfermedad de Alzheimer puede ayudar al experto en la materia a diseñar protocolos de inmunización terapéuticos humanos apropiados.

5 **Ejemplo XII. Prevención y Tratamiento de Sujetos Humanos**

Se realiza un ensayo de fase I de una sola dosis para determinar la seguridad en seres humanos. Se administra un agente terapéutico en dosificaciones crecientes a diferentes pacientes empezando desde aproximadamente 0,01 el nivel de eficacia supuesto, y aumentando en un factor de tres hasta un nivel de aproximadamente 10 veces la dosificación eficaz en ratón.

Se realiza un ensayo de fase II para determinar la eficacia terapéutica. Se seleccionan pacientes con enfermedad de Alzheimer de prematura a media definida usando los criterios de la Asociación de la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (ADRDA) para una probable AD. Los pacientes adecuados tienen una puntuación en el intervalo de 12-26 en el Mini-Examen del Estado Mental (MMSE). Otros criterios de selección son que los pacientes probablemente sobrevivirán a la duración del estudio y carecen de problemas que puedan provocar complicaciones tales como el uso de medicaciones concomitantes que puedan interferir. Las evaluaciones basales de la función de los pacientes se realizan usando mediciones de psicometría clásicas, tales como el MMSE, y la ADAS, que es una escala exhaustiva para evaluar el estado y función en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer. Estas escalas psicométricas proporcionan una medida de la progresión de la enfermedad de Alzheimer. También pueden usarse escalas de vida cualitativas adecuadas para controlar el tratamiento. La progresión de la enfermedad también puede controlarse por MRI. También pueden controlarse los perfiles sanguíneos de los pacientes, incluyendo ensayos de anticuerpos específicos de inmunógeno y respuestas de linfocitos T.

Después de las medidas basales, los pacientes empiezan a recibir tratamiento. Se

distribuyen aleatoriamente y se tratan con agente terapéutico o placebo con un diseño ciego. Los pacientes se controlan al menos cada seis meses. La eficacia se determina por una reducción significativa en la progresión de un grupo de tratamiento con respecto a un grupo de placebo.

5 Se realiza un segundo ensayo de fase II para evaluar la conversión de pacientes desde pérdida de memoria prematura sin Enfermedad de Alzheimer, algunas veces denominada deterioro de la memoria asociado con la edad (AAMI) o deterioro cognitivo leve (MCI), a una probable Enfermedad de Alzheimer como se define por el criterio ADRDA. Los pacientes con alto riesgo de conversión en Enfermedad de Alzheimer se seleccionan entre una población no
10 clínica explorando poblaciones de referencia con respecto a signos prematuros de pérdida de memoria u otras dificultades asociadas con la sintomatología previa a la Enfermedad de Alzheimer, una historia familiar de Enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genéticos, edad, sexo y otras características que se ha observado que predicen un alto riesgo de Enfermedad de Alzheimer. Se recogen puntuaciones basales en escalas métricas adecuadas
15 incluyendo el MMSE y la ADAS junto con otras escalas métricas diseñadas para evaluar una población más normal. Estas poblaciones de pacientes se dividen en grupos adecuados con comparaciones con placebo frente a alternativas de dosificación con el agente. Estas poblaciones de pacientes se someten a seguimientos a intervalos de aproximadamente seis meses y la variable de valoración para cada paciente es si se convierte o no en Enfermedad de
20 Alzheimer probable como se define por los criterios ADRDA al final de la observación.

Materiales y Procedimientos Generales

A. Preparación de Anticuerpos de A β Policlonales y Monoclonales

El anticuerpo policlonal anti-A β se preparó a partir de sangre recogida de dos grupos de animales. El primer grupo consistía en 100 ratones Swiss Webster hembra, de 6 a 8 semanas
25 de edad. Se inmunizaron los días 0, 15 y 29 con 100 μ g de AN1792 combinado con CFA/IFA. Se administró una cuarta inyección el día 36 con la mitad de la dosis de AN1792. Se desangraron los animales después del sacrificio el día 42, se preparó suero y los sueros se reunieron para crear un total de 64 ml. El segundo grupo consistía en 24 ratones hembra isogénicos con los ratones PDAPP pero no transgénicos para el gen APP humano, de 6 a 9
30 semanas de edad. Se inmunizaron los días 0, 14, 28 y 56 con 100 μ g de AN1792 combinado con CFA/IFA. Estos animales también se desangraron después del sacrificio el día 63, se preparó el suero y se reunió para obtener un total de 14 ml. Se reunieron los dos lotes de suero. La fracción de anticuerpo se purificó usando dos vueltas secuenciales de precipitación con sulfato amónico saturado al 50%. El precipitado final se dializó frente a PBS y se ensayó
35 con respecto a la endotoxina. El nivel de endotoxina fue menor de 1 UE/mg.

Los anticuerpos monoclonales anti-A β se prepararon a partir de líquido ascítico. El líquido primero se deslipidó por la adición de sulfato de dextrano sódico concentrado a líquido ascítico enfriado con hielo por agitación en hielo para alcanzar una concentración final del 0,238%. Después se añadió CaCl₂ concentrado con agitación para alcanzar una concentración final de 64 mM. Esta solución se centrifugó a 10.000 x g y el sedimento se desechó. El sobrenadante se agitó en hielo con un volumen igual de sulfato amónico saturado añadido gota a gota. La solución se centrifugó de nuevo a 10.000 x g y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió y se dializó frente a Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,4 M, pH 7,5. Esta fracción se aplicó a una Columna Pharmacia FPLC Sepharose Q y se eluyó con un gradiente inverso de NaCl de 0,4 M a 0,275 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5.

El pico de anticuerpos se identificó por absorbancia a 280 nm y se reunieron las fracciones apropiadas. La preparación de anticuerpo purificado se caracterizó midiendo la concentración de proteína usando el procedimiento BCA y la pureza usando SDS-PAGE. El conjunto también se ensayó con respecto a la endotoxina. El nivel de endotoxina fue menor de 1 UE/mg. Se asignaron títulos menores de 100 arbitrariamente a un valor de título de 25.

B. Medición de Títulos de Anticuerpo

Se extrajo sangre de los ratones realizando un pequeño corte en la vena de la cola y recogiendo aproximadamente 200 μ l de sangre en un tubo de microcentrífuga. Se extrajo sangre de las cobayas afeitando primero el área posterior del corvejón y usando después una aguja de calibre 18 para hacer una muesca en la vena del metatarso y recoger la sangre en tubos de microcentrífuga. La sangre se dejó coagular durante una hora a temperatura ambiente (TA), se sometió a agitación vorticial y después se centrifugó a 14.000 x g durante 10 minutos para separar el coágulo del suero. El suero después se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y se almacenó a 4°C hasta que se tituló.

Los títulos de anticuerpos se midieron por ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (placas Costar EIA) con 100 μ l de una solución que contenía 10 μ g/ml de A β 42 o SAPP u otros antígenos como se indica en cada uno de los informes individuales en Tampón de Recubrimiento de Pocillos (fosfato sódico 0,1 M, pH 8,5, azida sódica al 0,1%) y se mantuvieron durante una noche a TA. Los pocillos se aspiraron y se añadieron sueros a los pocillos empezando a una dilución de 1/100 en Diluyente para especímenes (fosfato sódico 0,014 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, albúmina de suero bovino al 0,6%, timerosal al 0,05%). Se realizaron directamente siete diluciones seriadas de las muestras en las placas en etapas de tres veces para alcanzar una dilución final de 1/218.700. Las diluciones se incubaron en los pocillos de las placas revestidas durante una hora a TA. Las placas después se lavaron cuatro veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. El

segundo anticuerpo, una Ig de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (obtenida en Boehringer Mannheim), se añadió a los pocillos como 100 µl de una dilución 1/3000 en Diluyente para especímenes y se incubó durante una hora a TA. Las placas se lavaron de nuevo cuatro veces en PBS, Tween 20. Para revelar el cromógeno, se añadieron 100 µl de Slow TMB (3,3',5,5'-tetrametil bencidina obtenida en Pierce Chemicals) a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a TA. La reacción se detuvo por la adición de 25 µl de H₂SO₄ 2 M. Después se leyó la intensidad de color en un Molecular Devices Vmax a (450 nm – 650nm).

Los títulos se definieron como la inversa de la dilución de suero que proporcionaba la mitad de la DO máxima. La DO máxima se tomó generalmente a partir de una dilución inicial de 1/100 excepto en casos con títulos muy altos, en cuyo caso fue necesaria una dilución inicial superior para establecer la DO máxima. Si el punto del 50% estaba entre dos diluciones, se realizaba una extrapolación lineal para calcular el título final. Para calcular la media geométrica de títulos de anticuerpo se asignaron arbitrariamente títulos menores de 100 a un valor de título de 25.

C. Preparación de Tejido Cerebral

Después de la eutanasia, los cerebros se retiraron y se preparó un hemisferio para análisis inmunohistoquímico, mientras que se diseccionaron tres regiones cerebrales (hipocampo, corteza y cerebelo) a partir del otro hemisferio y se usaron para medir la concentración de diversas proteínas Aβ y formas de APP usando ELISA específicos (Johnson-Wood y col., *supra*).

Los tejidos destinados para los ELISA se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón de guanidina enfriado con hielo (guanidina-HCl 5,0 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Los homogeneizados se mezclaron por agitación suave usando un Adams Nutator (Fisher) durante tres a cuatro horas a TA, y después se almacenaron a -20°C antes de la cuantificación de Aβ y APP. Los experimentos previos han demostrado que los analitos eran estables en estas condiciones de almacenamiento, y que la proteína Aβ sintética (Bachem) podía recuperarse cuantitativamente cuando se añadía a homogeneizados de tejido cerebral de control de ratones compañeros de camada (Johnson-Wood y col., *supra*).

D. Medición de los Niveles de Aβ

Los homogeneizados cerebrales se diluyeron 1:10 con Diluyente de Caseína enfriado con hielo (caseína al 0,25%, PBS, azida sódica al 0,05%, 20 µg/ml de aprotinina, EDTA 5 mM, pH 8,0, 10 µg/ml de leupeptina) y después se centrifugaron a 16.000 x g durante 20 min a 4°C. Los patrones de proteína Aβ sintética (1-42 aminoácidos) y los patrones de APP se prepararon para incluir guanidina 0,5 M y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% en la composición final.

El ELISA tipo sándwich de A β "total" utiliza anticuerpo monoclonal 266, específico para los aminoácidos 13-28 de A β (Seubert y col., *supra*), como anticuerpo de captura, y anticuerpo monoclonal biotinilado 3D6, específico para los aminoácidos 1-5 de A β (Johnson-Wood y col., *supra*), como anticuerpo indicador. El anticuerpo monoclonal 3D6 no reconoce APP secretada ni APP de longitud completa, sino que sólo detecta especies de A β con un ácido aspártico amino-terminal. Este ensayo tiene un límite inferior de sensibilidad de ~ 50 ng/ml (11 nM) y no muestra reactividad cruzada con la proteína A β endógena murina a concentraciones de hasta 1 ng/ml (Johnson-Wood y col., *supra*).

El ELISA tipo sándwich específico de A β 1-42 emplea el mA β 21F12, específico para los aminoácidos 33-42 de A β (Johnson-Wood, y col., *supra*), como anticuerpo de captura. El mA β 3D6 biotinilado también es el anticuerpo indicador en este ensayo, que tiene un límite inferior de sensibilidad de aproximadamente 125 μ g/ml (28 μ M, Johnson-Wood y col., *supra*). Para los ELISA de A β , se aplicaron como revestimiento 100 μ l del mA β 266 (a 10 μ g/ml) o mA β 21F12 (a 5 μ g/ml) en los pocillos de placas de inmunoensayo de 96 pocillos (Costar) por incubación durante una noche a TA. La solución se retiró por aspiración y los pocillos se bloquearon por la adición de 200 μ l de albúmina de suero humano al 0,25% en tampón PBS durante al menos 1 hora a TA. Se retiró la solución de bloqueo y las placas se almacenaron desecadas a 4°C hasta que se usaron. Las placas se rehidrataron con tampón de lavado [solución salina taponada con Tris (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5), más Tween 20 al 0,05%] antes del uso. Las muestras y los patrones se añadieron en alícuotas por triplicado de 100 μ l por pocillo y después se incubaron durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron al menos tres veces con Tampón de Lavado entre cada etapa del ensayo. Se añadió el mA β 3D6 biotinilado, diluido a 0,5 μ g/ml en Tampón de Ensayo de Caseína (caseína al 0,25%, PBS, Tween 20 al 0,05%, pH 7,4) y se incubó en los pocillos durante 1 hora a TA. A los pocillos se añadió un conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante (Avidin-HRP obtenido en Vector, Burlingame, CA), diluido 1:4000 en Tampón de Ensayo de Caseína, durante 1 hora a AT. Se añadió el substrato colorimétrico, Slow TMB-ELISA (Pierce), y se dejó reaccionar durante 15 minutos a TA, después de lo cual la reacción enzimática se detuvo por la adición de 25 μ l de H₂SO₄ N. El producto de reacción se cuantificó usando un Molecular Devices Vmax que mide la diferencia en absorbancia a 450 nm y 650 nm.

E. Medición de los Niveles de APP

Se utilizaron dos ensayos de APP diferentes. El primero, denominado APP- α /FL, reconoce tanto la forma APP-alfa (α) como las formas de longitud completa (FL) de APP. El segundo ensayo es específico para APP- α . El ensayo de APP- α /FL reconoce la APP secretada que incluye los primeros 12 aminoácidos de A β . Como el anticuerpo indicador (2H3) no es

específico para el sitio de corte de α , que aparece entre los aminoácidos 612-613 de APP⁶⁹⁵ (Esch y col., Science 248:1122-1124 (1190)); este ensayo también reconoce APP de longitud completa (APP-FL). Experimentos preliminares usando anticuerpos de APP inmovilizados contra la cola citoplásmica de APP-FL para reducir en homogeneizados cerebrales APP-FL sugieren que aproximadamente el 30-40% de APP- α /FL APP es FL (datos no mostrados). El anticuerpo de captura tanto para el ensayo de APP- α /FL como para el ensayo de APP- α es el mAb 8E5, inducido contra los aminoácidos 444 a 592 de la forma de APP⁶⁹⁵ (Games y col., supra). El mAb indicador para el ensayo de APP- α /FL es el mAb 2H3, específico para los aminoácidos 597-608 de APP⁶⁹⁵ (Johnson-Wood y col., supra) y el anticuerpo indicador para el ensayo de APP- α es un derivado biotinilado del mAb 16H9, inducido contra los aminoácidos 605 a 611 de APP. El límite inferior de sensibilidad del ensayo de APP- α FL es de aproximadamente 11 ng/ml (150 pM) (Johnson-Wood y col.) y el del ensayo específico de APP- α es de 22 ng/ml (0,3 nM). Para los dos ensayos de APP, se aplicó el mAb 8E5 como un revestimiento sobre los pocillos de placas de EIA de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente para el mAb 266. Como patrón de referencia para el ensayo de APP- α y el ensayo de APP- α /FL (Esch y col., supra) se usó APP- α secretada recombinante purificada. Las muestras de homogeneizado cerebral en guanidina 5 M se diluyeron 1:10 en Diluyente para especímenes de ELISA (tampón fosfato 0,014 M, pH 7,4, albúmina de suero bovino al 0,6%, timerosal al 0,05%, NaCl 0,5 M, NP40 al 0,1%). Después se diluyeron 1:4 en Diluyente para especímenes que contenía guanidina 0,5 M. Después, los homogeneizados diluidos se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 segundos a TA. Los patrones de APP y las muestras se añadieron a la placa en alícuotas por duplicado y se incubaron durante 1,5 horas a TA. El anticuerpo indicador biotinilado 2H3 o 16H9 se incubó con las muestras durante 1 hora a TA. La fosfatasa alcalina-estreptavidina (Boehringer Mannheim), diluida a 1:1.000 en diluyente para especímenes, se incubó en los pocillos durante 1 hora a TA. Se añadió el substrato fluorescente 4-metil-umbeliferil-fosfato durante una incubación a TA de 30 minutos y las placas se leyeron en un fluorímetro Cytofluor tm 2350 (Millipore) a una excitación de 365 nm y una emisión de 450 nm.

F. Inmunohistoquímica

Se fijaron cerebros durante tres días a 40°C en paraformaldehído al 4% en PBS y después se almacenaron durante uno a siete días a 4°C en paraformaldehído al 1% en PBS hasta que se seccionaron. Se cortaron secciones de corona de cuarenta micrómetros de espesor en un vibrátomo a TA y se almacenaron en crioprotector (glicerol al 30%, etilenglicol al 30% en tampón fosfato) a -20°C antes del procesamiento de inmunohistoquímica. Para cada cerebro, se incubaron seis secciones a nivel del hipocampo dorsal, cada una separada por

intervalos consecutivos de 240 μ m, durante una noche con uno de los siguientes anticuerpos: (1) un anti-A β biotinilado (mAb, 3D6, específico para A β humano) diluido a una concentración de 2 μ g/ml en PBS y suero de caballo al 1%; o (2) un mAb biotinilado específico para APP humana, 8E5, diluido a una concentración de 3 μ g/ml en PBS y suero de caballo al 1,0 %; o (3) un mAb específico para proteína ácida fibrilar glial (GFAP; Sigma Chemical Co.) diluido 1:500 con Triton X-100 al 0,25% y suero de caballo al 1%, en solución salina taponada con Tris, pH 7,4 (TBS); o (4) un mAb específico para CD11b, antígeno MAC-1, (Chemicon International) diluido 1:100 con Triton X-100 al 0,25% y suero de conejo al 1% en TBS; o (5) un mAb específico para el antígeno del MHC II, (Pharmingen) diluido 1:100 con Triton X-100 al 0,25% y suero de conejo al 1% en TBS; o (6) un mAb de rata específico para CD43 (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS o (7) un mAb de rata específico para CD 45RA (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS; u (8) un monoclonal de rata de A β específico para CD 45RB (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS; o (9) un monoclonal de rata de A β específico para CD 45 (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS; o (10) un policlonal biotinilado de A β de hámster específico para CD3e (Pharmingen) diluido 1:100 con suero de conejo al 1% en PBS o (11) un mAb de rata específico para CD3 (Serotec) diluido 1:200 con suero de conejo al 1% en PBS; o con (12) una solución de PBS que carecía de un anticuerpo primario que contenía suero de caballo normal al 1%.

Las secciones que reaccionaron con soluciones de anticuerpo indicadas en 1,2 y 6-12 anteriores se pretrataron con Triton X-100 al 1,0% y peróxido de hidrógeno al 0,4% en PBS durante 20 min a TA para bloquear la peroxidasa endógena. Después se incubaron durante una noche a 4°C con anticuerpo primario. Después, las secciones que reaccionaron con mAb 3D6 u 8E5 o CD3e se hicieron reaccionar durante una hora a TA con un complejo de peroxidasa de rábano picante-avidina-biotina con componentes del kit "A" y "B" diluidos 1:75 en PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.). Las secciones que reaccionaron con anticuerpos específicos para CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 y la solución de PBS que carecía de anticuerpo primario se incubaron durante 1 hora a TA con IgG anti-rata biotinilada (Vector) diluida 1:75 en PBS o IgG biotinilada anti-ratón (Vector) diluida 1:75 en PBS, respectivamente. Después, las secciones se hicieron reaccionar durante una hora a TA con un complejo de peroxidasa de rábano picante-avidina-biotina con componentes del kit "A" y "B" diluidos 1:75 en PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

Las secciones se revelaron en peróxido de hidrogeno al 0,01% y 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0,05% a TA. Las secciones destinadas a la incubación con anticuerpos específicos para GFAP, MAC-1 y MHC II se pretrataron con peróxido de hidrógeno al 0,6% a TA para

bloquear la peroxidasa endógena y después se incubaron durante una noche con el anticuerpo primario a 4°C. Las secciones que reaccionaron con el anticuerpo GFAP se incubaron durante 1 hora a TA con IgG anti-ratón biotinilada obtenida en caballo (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluida 1:200 con TBS. Las secciones incubadas con el anticuerpo monoclonal específico para MAC-1 o MHC-II como anticuerpo primario después se hicieron reaccionar durante una hora a TA con IgG anti-rata biotinilada obtenida en conejo diluida 1:200 con TBS, seguido de incubación durante una hora con complejo de avidina-biotina-peroxidasa diluido 1:1000 con TBS. Después, las secciones incubadas con anticuerpos específicos para GFAP, MAC-1 y MHC II se visualizaron por tratamiento a TA con DAB al 0,05%, peróxido de hidrogeno al 0,01%, cloruro de níquel al 0,04% y TBS durante 4 y 11 minutos, respectivamente.

Las secciones inmunomarcadas se montaron en portaobjetos de vidrio (VWR, portaobjetos Superfrost), se secaron al aire durante una noche, se sumergieron en Propar (Anatech) y se cubrieron con cubreobjetos usando Permount (Fisher) como medio de montaje.

Para teñir de contraste las placas de A β , se montó una subserie de las secciones positivas para GFAP en portaobjetos Superfrost y se incubaron Thioflavin S acuoso al 1% (Sigma) durante 7 minutos después del procesamiento inmunohistoquímico. Después, las secciones se deshidrataron y se limpiaron en Propar, y después se cubrieron con cubreobjetos montados con Permount.

G. Análisis de Imágenes

Para la cuantificación de los portaobjetos inmunorreactivos se usó un Sistema de Análisis de Imágenes Videometric 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) asociado a un microscopio Nikon Microphot-FX a través de una videocámara CCD y un monitor Sony Trinitron. La imagen de la sección se almacenó en una memoria de vídeo y se determinó un umbral basado en saturación y color para seleccionar y calcular el área total de píxeles ocupada por las estructuras inmunomarcadas. Para cada sección, se perfiló manualmente el hipocampo y se calculó el área total de píxeles ocupada por el hipocampo. El porcentaje de carga amiloide se midió como: (la fracción del área del hipocampo que contenía depósitos de A β inmunorreactivos con mAb 3D6) x 100. De forma similar, el porcentaje de carga neurítica se midió como: (la fracción del área del hipocampo que contenía neuritas distróficas reactivas con el anticuerpo monoclonal 8E5) x 100. El sistema C-Imaging (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) que hacía funcionar el programa de aplicación de software Simple 32 se asoció a un microscopio Nikon Microphot-FX a través de una cámara Optronics y se usó para cuantificar el porcentaje de corteza retrosplenial ocupada por astrocitos positivos para GFAP y microglía positiva para MAC-1 y MHC II. La imagen de la sección que inmunorreaccionó se almacenó

en una memoria de vídeo y se determinó el umbral basado en monocromo para seleccionar y calcular el área total de píxeles ocupada por células inmunomarcadas. Para cada sección, se perfiló manualmente la corteza retrosplenial (RSC) y se calculó el área total de píxeles ocupada por la RSC. El porcentaje de astrocitosis se definió como: (la fracción de RSC ocupada por astrocitos reactivos con GFAP) x 100. De forma similar, el porcentaje de microgliosis se definió como: (la fracción de la RSC ocupada por microglía reactiva con MAC-1 o MHC II) x 100. Para todos los análisis de imágenes, se cuantificaron seis secciones a nivel del hipocampo dorsal, cada una separada por intervalos consecutivos de 240 µm, para cada animal. En todos los casos, el estado de tratamiento de los animales era desconocido para el observador.

Por lo anterior, será evidente que la invención proporciona varios usos. Por ejemplo, la invención proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos contra Aβ descritos anteriormente en el tratamiento y profilaxis de enfermedades amiloidogénicas, o en la fabricación de un medicamento para uso en la misma.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> NEURALAB LIMITED, <i>et al.</i>
5	<120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE RECONOCEN EL PÉPTIDO BETA AMILOIDE
	<130> ELN-002CPPC
10	<150> US 10/388.389 <151> 12-03-2003
	<160> 63
15	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
	<210> 1
	<211> 396
	<212> ADN
20	<213> Mus musculus
	<220>
	<221> CDS
	<222> (1)...(396)
25	<221> péptido_señal
	<222> (1)...(60)
	<400> 1
30	

```

atg atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg 48
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20 -15 -10 -5

gaa acc aac ggt tat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg 96
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
1 5 10

gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc 144
Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
15 20 25

ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg 192
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
30 35 40

cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac 240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45 50 55 60

tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttt 288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

aca ctg aaa atc agc aga ata gag gct gag gat ttg gga ctt tat tat 336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr
80 85 90

tgc tgg caa ggt aca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag 384
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
95 100 105

ctg gaa atc aaa 396
Leu Glu Ile Lys
110

```

<210> 2

<211> 132

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SEÑAL

10

<222> (1)...(20)

<400> 2

110

```

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

```

<210> 3

<211> 414

5

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)...(414)

<221> péptido_señal

<222> (1)...(57)

15

<400> 3

```

atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gtc ctt gtt tta aaa ggt 48
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
          -15          -10          -5

gtc cag tgt gaa gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag 96
Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
          1          5          10

cct gga gcg tct ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144
Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          15          20          25

```

111

agc aac tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag aat tca gac aag agg ctg	192
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu	
30 35 40 45	
gag tgg gtt gca tcc att agg agt ggt ggt ggt aga acc tac tat tca	240
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser	
50 55 60	
gac aat gta aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gag aat gcc aag aac	288
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn	
65 70 75	
acc ctg tac ctg caa atg agt agt ctg aag tct gag gac acg gcc ttg	336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu	
80 85 90	
tat tat tgt gtc aga tat gat cac tat agt ggt agc tcc gac tac tgg	384
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp	
95 100 105	
ggc cag ggc acc act gtc aca gtc tcc tca	414
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115	

<210> 4

<211> 138

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SEÑAL

10

<222> (1)...(19)

<400> 4

112

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
      -15      -10      -5
Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
      1      5      10
Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      15      20      25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
      30      35      40      45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
      50      55      60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
      65      70      75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
      80      85      90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
      95      100      105
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      110      115

```

<210> 5

<211> 132

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> SEÑAL

10

<222> (1)...(20)

<223> Región variable de cadena ligera de 3D6 humanizado

<400> 5

```

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

```

15

<210> 6

<211> 125

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

10

<222> (1)...(13)

<400> 6

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

15

<210> 7

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 7

114

```

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

```

<210> 8

<211> 138

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de 3D6 humanizado

10

<221> SEÑAL

<222> (1)...(19)

<400> 8

15

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
          -15           -10           -5
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          1           5           10
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
15           20           25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
30           35           40           45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
          50           55           60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
65           70           75
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
80           85           90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
95           100           105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110           115

```

<210> 9

115

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 9

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30
Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

```

```

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 10

10

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

15

```

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

```

<210> 11
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(20)

10

<223> Región variable de cadena ligera de 3D6 humanizado

<400> 11

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

Cys	Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
		95					100					105			
Val	Glu	Ile	Lys												
		110													

15

<210> 12
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 3D6 humanizado

<221> SEÑAL

<222> (1)...(19)

5

<400> 12

Met	Asn	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Phe	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Lys	Gly
				-15					-10					-5	
Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
			1				5					10			
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
	15					20					25				
Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
30					35					40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ser
				50					55					60	
Asp	Asn	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
			65					70				75			
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
		80					85					90			
Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Tyr	Asp	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ser	Asp	Tyr	Trp
	95					100					105				
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
110						115									

<210> 13

10

<211> 393

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

15

<221> CDS

<222> (1)...(393)

<221> péptido_señal

<222> (1)...(57)

20

<400> 13

118

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gta ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 -15 -10 -5

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 1 5 10

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
 15 20 25

ata cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192
 Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 30 35 40 45

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 50 55 60

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75

ctc aag atc aag aaa gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc 336
 Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
 80 85 90

ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg 384
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 95 100 105

gag ctg gaa
 Glu Leu Glu 393
 110

<210> 14

<211> 131

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SEÑAL

10

<222> (1)...(19)

<400> 14

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

<210> 15

<211> 426

5

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)...(426)

<221> péptido_señal

<222> (1)...(57)

15

<400> 15

120

atg gac agg ctt act tcc tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat	48
Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr	
-15 -10 -5	
gtc ctg tcc cag gct act ctg aaa gag tct ggc cct gga ata ttg cag	96
Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln	
1 5 10	
tcc tcc cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg	144
Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu	
15 20 25	
agc act tct ggt atg gga gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag	192
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys	
30 35 40 45	
ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gat gac aag cgc tat	240
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr	
50 55 60	
aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg	
65 70 75	
aag cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac cct gca gat act gcc	336
Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala	
80 85 90	
aca tac tac tgt gtt cga agg ccc att act ccg gta cta gtc gat gct	384
Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala	
95 100 105	
atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	426
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

<210> 16

<211> 142

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SEÑAL

10

<222> (1) ... (19)

<400> 16

121

Met	Asp	Arg	Leu	Thr	Ser	Ser	Phe	Leu	Leu	Leu	Ile	Val	Pro	Ala	Tyr
				-15				-10						-5	
Val	Leu	Ser	Gln	Ala	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln
			1				5					10			
Ser	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
	15					20				25					
Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys
30					35					40					45
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr
				50					55					60	
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Arg
			65					70					75		
Lys	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala
		80					85					90			
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Pro	Ile	Thr	Pro	Val	Leu	Val	Asp	Ala
	95					100					105				
Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
110					115					120					

<210> 17

<211> 136

5

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 17

```

tccgcaagct  tgccgccacc  atggacatgc  gcgtgcccgc  ccagctgctg  ggcttgetga  60
tgctgtgggt  gtccggctcc  tccggctacg  tggatgatgac  ccagtcccc  ctgtccctgc  120
ccgtgacccc  cggcga

```

15

<210> 18

<211> 131

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> cebador

<400> 18

122

```

ctgggggggac tggccgggct tctgcagcag ccagttcagg taggtcttgc cgtcggagtc 60
cagcaggggac tgggaggact tgcaggagat ggaggcgggc tcgccggggg tcacgggcag 120
ggacagggggg g                                     131

```

<210> 19

<211> 146

5

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 19

```

acctgaactg gctgctgcag aagccccggcc agtcccccca gcgcctgata tacctggtgt 60
ccaagctgga ctccggcgtg cccgaccgct tctccggctc cggtccggc accgacttca 120
ccctgaagat ctcccgcgtg gagggc                                     146

```

15

<210> 20

<211> 142

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> cebador

<400> 20

```

aattctagga tccactcacg cttgatctcc accttggtgc cctggccgaa ggtgcggggg 60
aagtgggtgc cctgccagca gtagtacacg cccacgtcct cggcctccac gcgggagatc 120
ttcaggggtga agtcggtgcc gg                                     142

```

25

<210> 21

<211> 16

<212> ADN

30

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 21

ctggggggac tggccg 16

5

<210> 22

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> cebador

<400> 22

acctgaactg gctgctgcag aa 22

15

<210> 23

<211> 138

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> cebador

25

<400> 23

acagaaagct tgccgccacc atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt 60
taaaagggtgt ccagtgtgag gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg 120
gcggctccct ggcctgt 138

30

<210> 24

<211> 135

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

124

<223> cebador

<400> 24

5 gccgccggag cggatggagg ccaccactc caggcccttg cggggggcct ggcgcaccca 60
 ggacatgccg tagttggaga aggtgaagcc ggaggcggcg caggacaggc gcaggagacc 120
 gccgggctgc accag 135

<210> 25

<211> 142

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 25

ctggagtggg tggcctccat ccgctccggc ggccggccgca cctactactc cgacaacgtg 60
 aagggccgct tcaccatctc ccgcgacaac gccaaagaact ccctgtacct gcagatgaac 120
 tccttgccgc cggaggacac cg 142

<210> 26

20 <211> 144

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> cebador

<400> 26

ctgcaaggat ccactcaccg gaggacacgg tcaccagggt gccctggccc cagtagtcgg 60
 aggagccgga gtagtggtcg tagcgcacgc agtagtacag ggccggtgtcc tcggcgcgca 120
 gggagttcat ctgcaggtac aggg 144

30

<210> 27

<211> 16

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 27	
	gccgccggag cggatg	16
10	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 28	
	ctggagtggg tggcctccat	20
20	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 29	
30	tccgcaagct tgccgccac	19
	<210> 30	
	<211> 29	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	

<220>

<223> cebador

5

<400> 30

aattctagga tccactcacg ctgatctc 29

<210> 31

<211> 23

10

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 31

acagaaagct tgccgccacc atg 23

<210> 32

<211> 22

20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

25

<400> 32

ctgcaaggat ccactcacg ga 22

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

35

<220>

127

<223> péptido ABeta nativo

<400> 33

	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr
5	1				5				10	

<210> 34

<211> 402

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> VL de versión 1 de h3D6

<400> 34

15

```

atggacatgc gcggtgcccgc ccagctgctg ggcttgcctga tgcctgtgggt gtccggctcc 60
tccggctacg tgggtgatgac ccagtcccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgagccc 120
gcctccatct cctgcaagtc ctcccagtc ctgctggact ccgacggcaa gacctacctg 180
aactggctgc tgcagaagcc cggccagtc cccagcgcc tgatctacct ggtgtccaag 240
ctggactccg gcggtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccctg 300

```

```

aagatctccc gcggtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctggca gggcacccac 360
ttcccccgca ccttcggcca gggcaccaag gtggagatca ag 402

```

<210> 35

<211> 402

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> VL de versión 2 de h3D6

25

<400> 35

128

```

atggacatgc gcgtgccgc ccagctgctg ggctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
tccggcgacg tggatgatgac ccagtcccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgagccc 120
gcctccatct cctgcaagtc ctcccagtc ctgtggact ccgacggcaa gacctacctg 180
aactggctgc tgcagaagcc cggccagtc cccagcgcc tgatctacct ggtgtccaag 240
ctggactccg gcgtgccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttaccctg 300
aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggctgtgact actgctggca gggcaccac 360
ttccccgca ccttcggcca gggcaccaag gtggagatca ag 402

```

<210> 36

<211> 414

5

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> VH de versión 1 de h3D6

10

<400> 36

```

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
tgccgcgcct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcg ccaggcccc 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240
gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaacg ccaagaactc cctgtacctg 300
cagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccctgtact actgcgtgcg ctacgaccac 360
tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctcc 414

```

15

<210> 37

<211> 414

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> VH de versión 2 de h3D6

<400> 37

```

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
tgccgcgcct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcg ccaggcccc 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240
gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaact ccaagaacac cctgtacctg 300
cagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccctgtact actgcgtgcg ctacgaccac 360
tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctcc 414

```

25

5

<210> 38

<211> 770

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Thr	Ala	Arg	1	5	10	15
Ala	Leu	Glu	Val	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro	20	25	30	
Gln	Ile	Ala	Met	Phe	Cys	Gly	Arg	Leu	Asn	Met	His	Met	Asn	Val	Gln	35	40	45	
Asn	Gly	Lys	Trp	Asp	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Thr	Cys	Ile	Asp	50	55	60	
Thr	Lys	Glu	Gly	Ile	Leu	Gln	Tyr	Cys	Gln	Glu	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	65	70	75	80
Gln	Ile	Thr	Asn	Val	Val	Glu	Ala	Asn	Gln	Pro	Val	Thr	Ile	Gln	Asn	85	90	95	
Trp	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Gln	Cys	Lys	Thr	His	Pro	His	Phe	Val	100	105	110	
Ile	Pro	Tyr	Arg	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	Leu	Leu	115	120	125	
Val	Pro	Asp	Lys	Cys	Lys	Phe	Leu	His	Gln	Glu	Arg	Met	Asp	Val	Cys	130	135	140	
Glu	Thr	His	Leu	His	Trp	His	Thr	Val	Ala	Lys	Glu	Thr	Cys	Ser	Glu	145	150	155	160
Lys	Ser	Thr	Asn	Leu	His	Asp	Tyr	Gly	Met	Leu	Leu	Pro	Cys	Gly	Ile	165	170	175	
Asp	Lys	Phe	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Cys	Pro	Leu	Ala	Glu	Glu	180	185	190	
Ser	Asp	Asn	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Glu	Glu	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	195	200	205	
Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys	210	215	220	
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	225	230	235	240
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu	245	250	255	
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile	260	265	270	
Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg	275	280	285	
Glu	Val	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Glu	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Met	Ile	290	295	300	
Ser	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Phe	Phe	305	310	315	320
Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	Thr	Glu	Glu	Tyr	325	330	335	
Cys	Met	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	340	345	350	
Thr	Gln	Glu	Pro	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Val	Lys	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	355	360	365	
Ala	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Asp	370	375	380	
Glu	Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	385	390	395	400
Lys	His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Glu	Trp	Glu	Glu	Ala	405	410	415	
Glu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Val	Ile	420	425	430	
Gln	His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	435	440	445	
Glu	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	Arg	Val	Glu	Ala	Met	450	455	460	
Leu	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	465	470	475	480

Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	Asn	Met	Leu	Lys	Lys	
				485					490						495	
Tyr	Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	Thr	Leu	Lys	His	Phe	
			500					505					510			
Glu	His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	Ala	Gln	Ile	Arg	Ser	
		515					520					525				
Gln	Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	Arg	Met	Asn	Gln	Ser	
	530					535					540					
Leu	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	
545					550					555					560	
Glu	Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Glu	Gln	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asp	Val	
				565					570					575		
Leu	Ala	Asn	Met	Ile	Ser	Glu	Pro	Arg	Ile	Ser	Tyr	Gly	Asn	Asp	Ala	
			580					585					590			
Leu	Met	Pro	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	
		595					600					605				
Val	Asn	Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Pro	Trp	His	Ser	Phe	
	610					615					620					
Gly	Ala	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Val	Glu	Pro	Val	
625					630					635					640	
Asp	Ala	Arg	Pro	Ala	Ala	Asp	Arg	Gly	Leu	Thr	Thr	Arg	Pro	Gly	Ser	
				645					650					655		
Gly	Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met	Asp	
			660					665					670			
Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys	Leu	
		675					680					685				
Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	
	690					695					700					
Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala	Thr	Val	Ile	Val	Ile	Thr	Leu	
705					710					715					720	
Val	Met	Leu	Lys	Lys	Lys	Gln	Tyr	Thr	Ser	Ile	His	His	Gly	Val	Val	
				725					730					735		
Glu	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	His	Leu	Ser	Lys	Met	
			740					745					750			
Gln	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Asn	Pro	Thr	Tyr	Lys	Phe	Phe	Glu	Gln	Met	
		755					760					765				
Gln	Asn															
	770															

<210> 39

<211> 40

5

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 39

actagtcgac atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg

40

5	<210> 40	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> cebador	
	<400> 40	
	actagtcgac atggagwcag acacactcct gytatgggt	39
	<210> 41	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 41	
	actagtcgac atgagtggtc tcactcaggt cctggsgttg	40
	<210> 42	
25	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 42	
	actagtcgac atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg	43
35	<210> 43	
	<211> 40	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 43	
	actagtcgac atggattwc aggtgcagat twtcagcttc	40
10	<210> 44	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 44	
	actagtcgac atgaggtkcy ytytsagyt yctgrgg	37
20	<210> 45	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 45	
30	actagtcgac atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g	41
	<210> 46	
	<211> 41	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	

<220>

<223> cebador

<400> 46

5

actagtcgac atgtggggay ctktttymm ttttcaatt g 41

<210> 47

<211> 35

<212> ADN

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 47

actagtcgac atggttrccw casctcagtt ccttg 35

<210> 48

<211> 37

20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

25

<400> 48

actagtcgac atgtatatat gttgtgtgc tatttct 37

<210> 49

<211> 38

30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> cebador

135

<400> 49

actagtcgac atggaagccc cagctcagct tctcttcc 38

<210> 50

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 50

ggatcccggg tggatggagg gaagatg 27

<210> 51

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 51

actagtcgac atgaaatgca gctgggtcat sttcttc 37

<210> 52

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 52

actagtcgac atgggatgga gctrtatcat sytctt 36

5	<210> 53		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
10	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 53		
	actagtcgac atgaagwtgt ggttaaactg ggTTTT	37	
15	<210> 54		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 54		
	actagtcgac atgractttg ggytcagctt grtt	35	
25	<210> 55		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 55		
	actagtcgac atggactcca ggctcaattt agttttcctt	40	
35	<210> 56		

137

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> cebador

<400> 56

actagtcgac atggctgtcy trsgcttrct cttctgc

37

10

<210> 57

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> cebador

<400> 57

actagtcgac atggratgga gckggrtctt tmtctt

36

20

<210> 58

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> cebador

<400> 58

actagtcgac atgagagtgc tgattctttt gtg

33

30

<210> 59

<211> 40

<212> ADN

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

5

<400> 59

actagtcgac atggmttggg tgtggamctt gctattcctg 40

<210> 60

10

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> cebador

<400> 60

actagtcgac atgggcagac ttacattctc attcctg 37

<210> 61

20

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25

<223> cebador

<400> 61

actagtcgac atggatttg ggctgatttt tttattg 38

30

<210> 62

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> cebador

<400> 62

5

actagtcgac atgatgggtg taagtcttct gtacctg

37

<210> 63

<211> 27

<212> ADN

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 63

ggatcccggg agtggataga ctgatgg

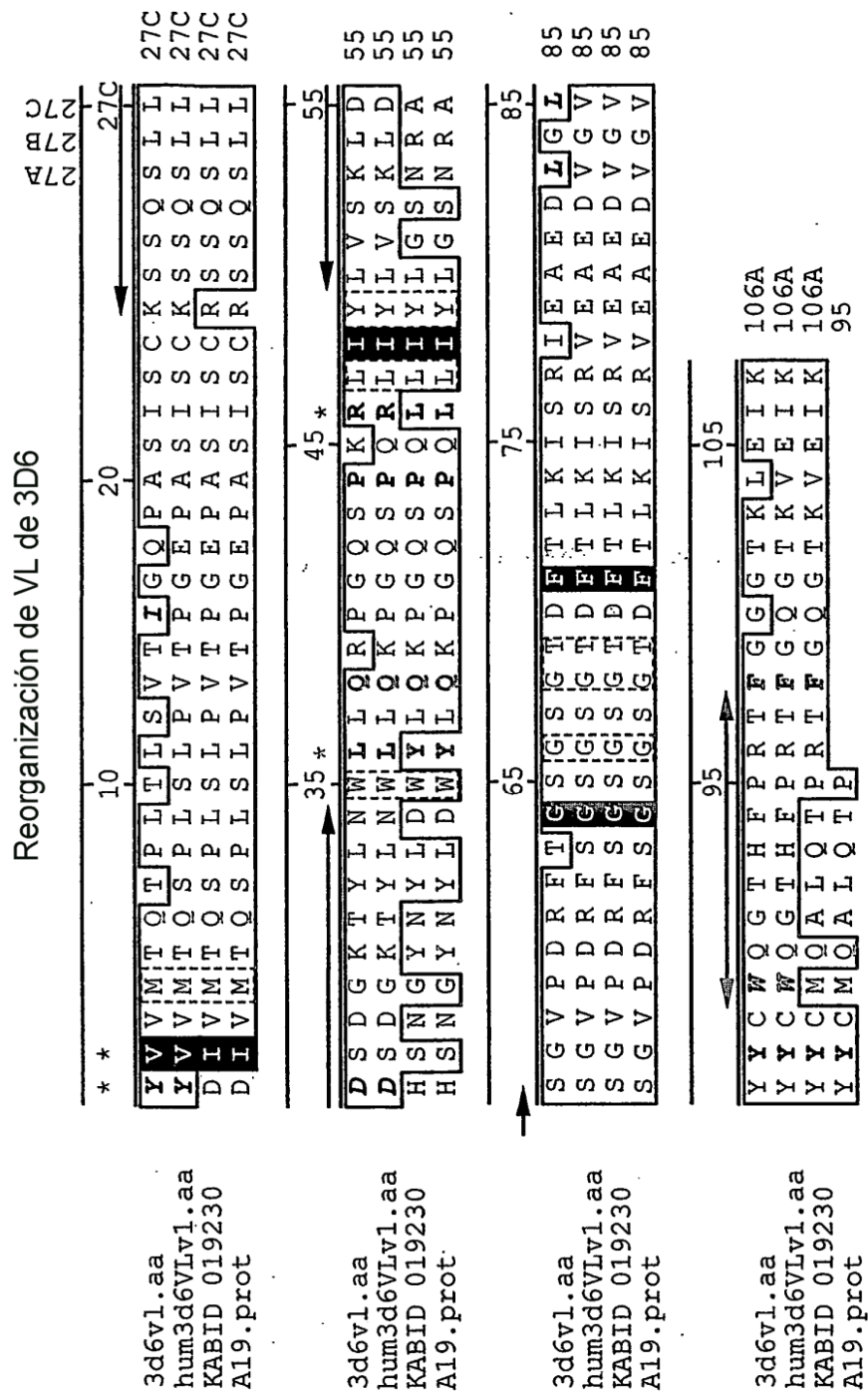
27

REIVINDICACIONES

1. Una inmunoglobulina humanizada para uso en terapia, que comprende una región de cadena pesada variable como se expone en los restos 1-119 de la SEC ID N°: 12 y una región de cadena ligera variable como se expone en los restos 1-112 de la SEC ID N°: 11, comprendiendo la inmunoglobulina una región Fc que comprende una modificación de aminoácidos en el resto de aminoácido 234, 235, 236 ó 237, con respecto a la IgG1 3D6 humanizada, de tal forma que la modificación reduce la unión a un receptor FcγRI.
2. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 1, que es de isotipo IgG1 humano.
3. Una inmunoglobulina quimérica para uso en terapia que comprende las secuencias de región variable de inmunoglobulina 3D6 expuestas como restos 1 a 112 de la SEC ID N°: 2 y restos 1 a 119 de la SEC ID N°:4, y secuencias de región constante de cadena pesada y ligera humana, en la que la secuencia de la región constante de cadena pesada humana comprende una región Fc que comprende una modificación de aminoácidos en el resto de aminoácido 234, 235, 236 ó 237 con respecto a la IgG1 3D6 quimérica, de tal forma que la inmunoglobulina modificada tiene menor unión a un receptor FcγRI.
4. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad amiloidogénica.
5. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 4, en la que la enfermedad amiloidogénica es la enfermedad de Alzheimer.
6. La inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que la dosificación eficaz es de 1 mg/kg o 10 mg/kg de peso corporal.
7. Una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina humanizada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un vehículo farmacéutico.
8. Una molécula o moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.

9. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.
- 5 10. Un procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 en condiciones tales que se produzca el anticuerpo y aislar dicho anticuerpo de la célula huésped o el cultivo.

FIG. 1



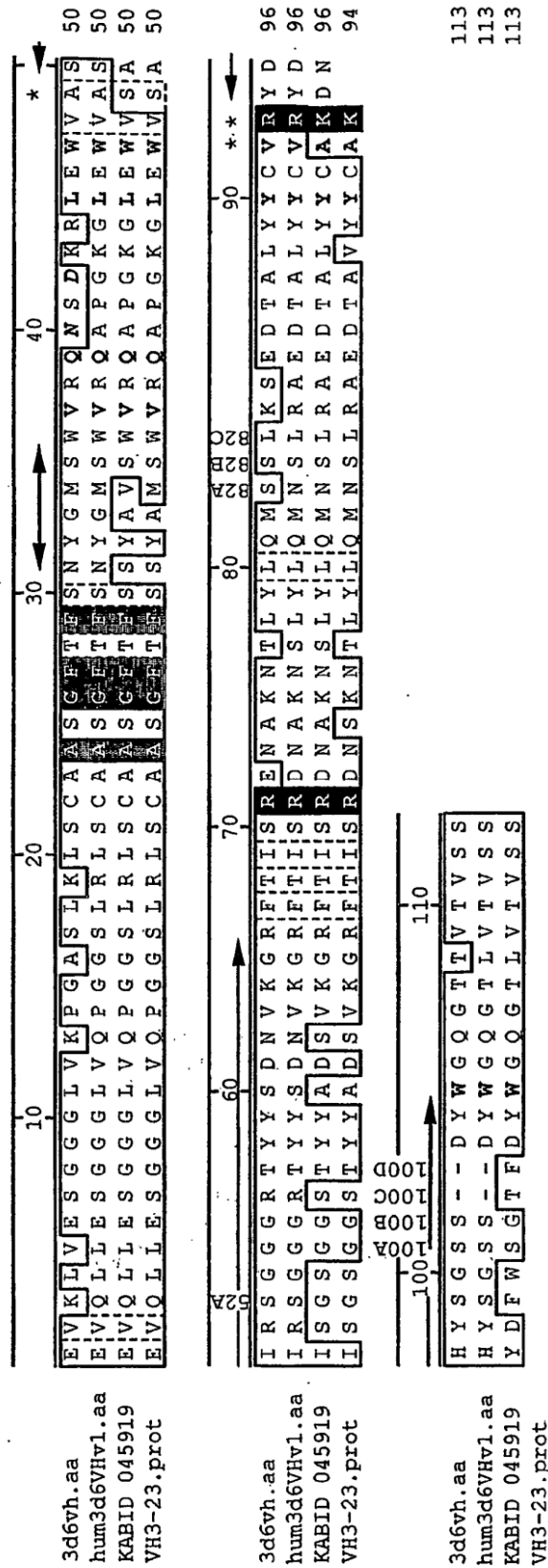
"Decoración N° 1": Restos del recuadro que corresponden exactamente a hum3D6VLv1.aa. Numeración de restos de Kabat.

3d6v1.aa - Secuencia murina donadora hum3d6VLv1.aa - 3d6 humanizado

KABID 019230 - marco conservado aceptor humano A19.prot - VH de línea germinal humana

FIG. 2

Reorganización de VH de 3D6



'Decoración N° 1': Restos del recuadro que corresponden exactamente a hum3d6VHv1.aa. Numeración de restos de Kabat.

- 3d6vh.aa - Secuencia murina donadora
- hum3d6VHv1.aa - VH de 3d6 humanizado
- KABID 045919 - marco conservado aceptor humano
- VH3-23.prot - VH de línea germinal humana

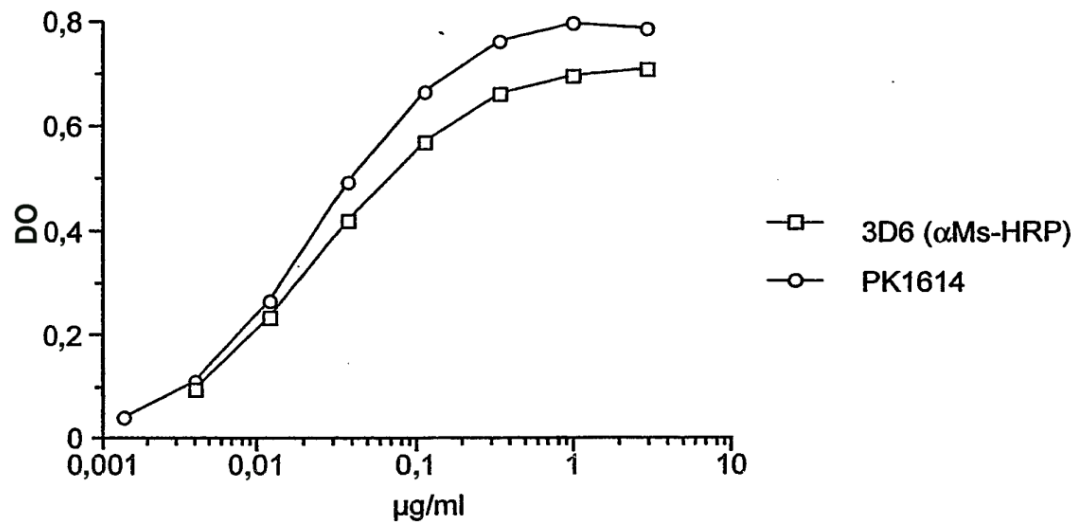
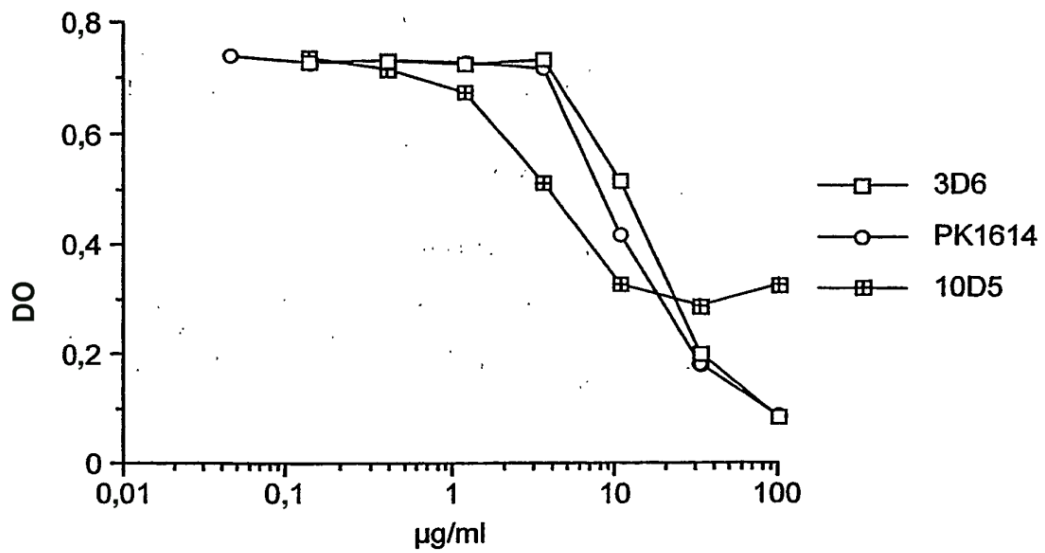
FIG. 3AELISA DE A β 42**FIG. 3B**ELISA DE A β 42
competición de 3D6-B

FIG. 4

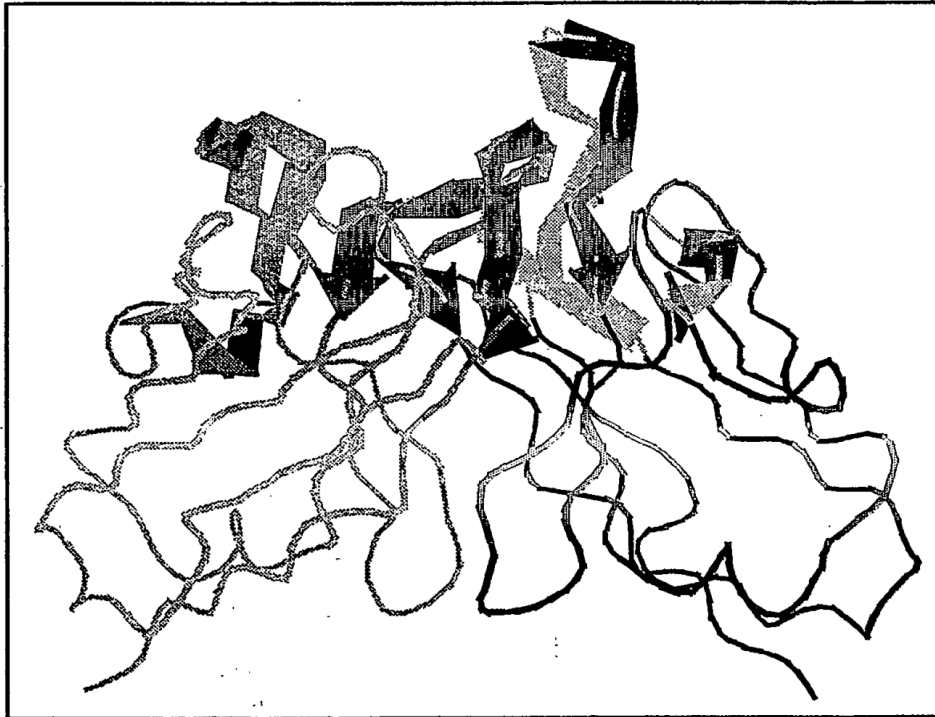
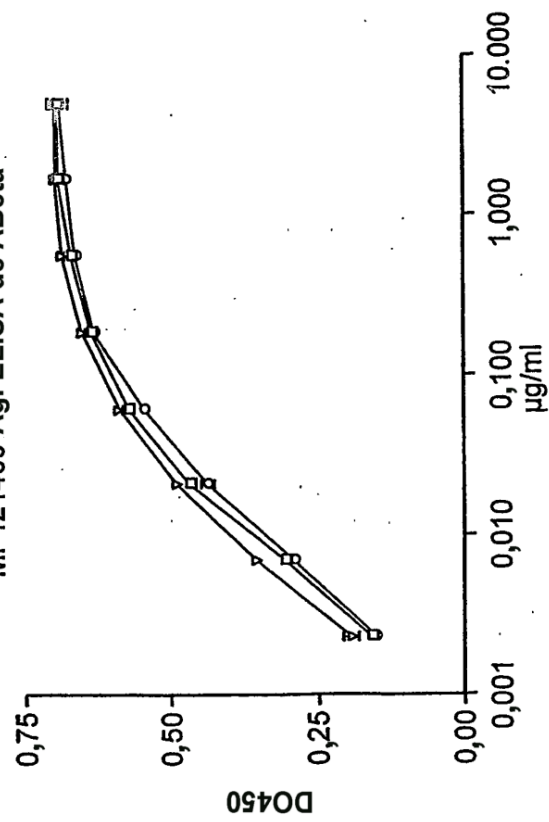


FIG. 5A

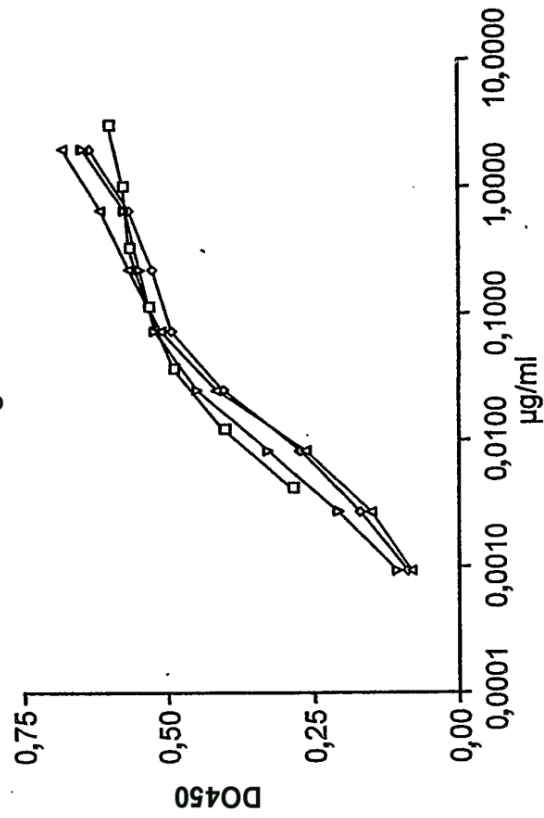
MF121400 Ag. ELISA de ABeta



□ h3D6 v1 lote n° 837
 ○ h3D6 v1 lote n° 837b
 △ ch3D6 PK1614

FIG. 5B

MF011101 Ag. ELISA de ABeta



□ lote 840 H1L2
 △ lote 837 H1L1
 ○ lote 842 H1L1
 ◇ lote 843 H2L2

FIG. 6

Tinción de secciones de cerebro PDAPP con 3D6 humanizado
Titulaciones de MAb en secciones de cerebro PD-APP
Canales 70-256

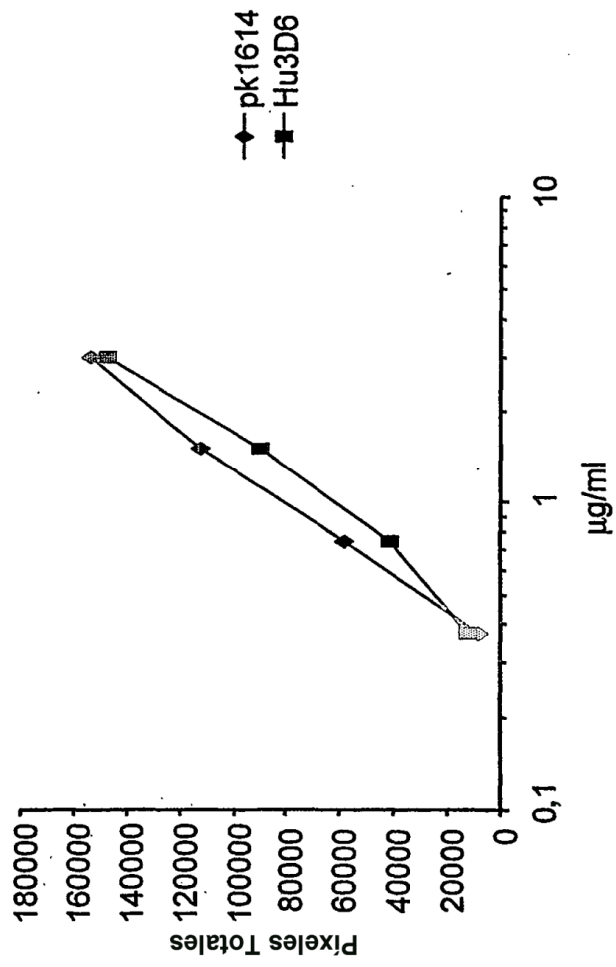


FIG. 7

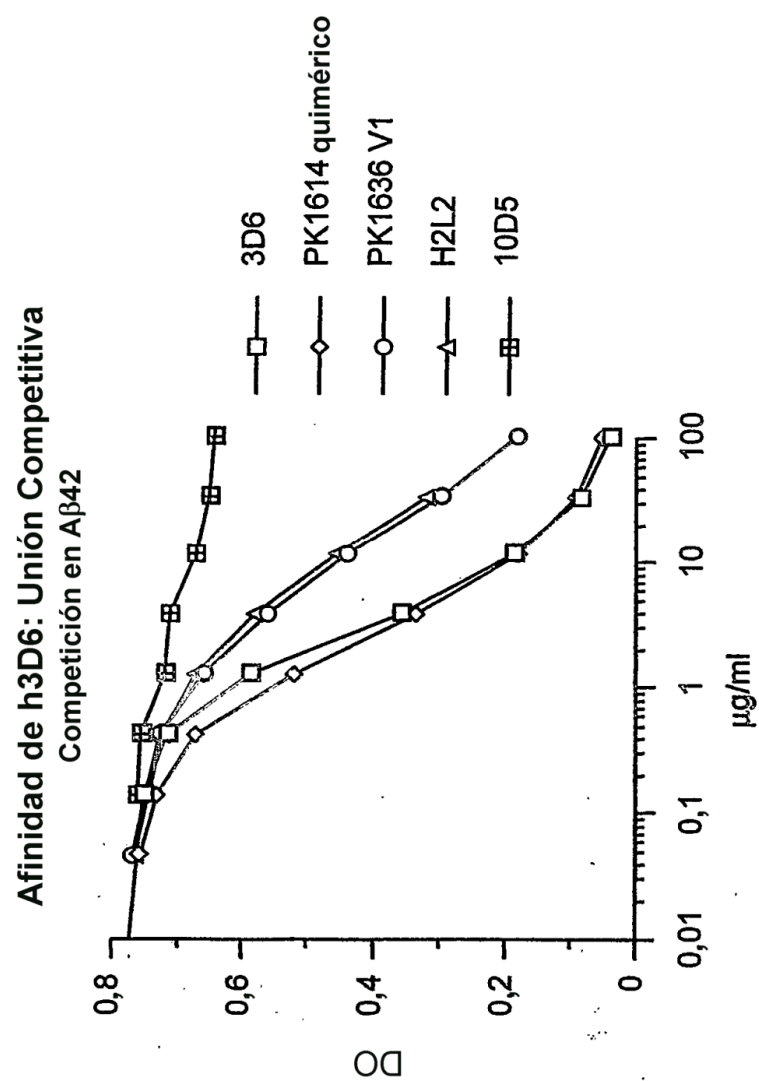


FIG. 8

Ensayo *Ex vivo*: Estimulación de fagocitosis
microglial por h3D6 PDAPP *Ex vivo*
266/3D6-B

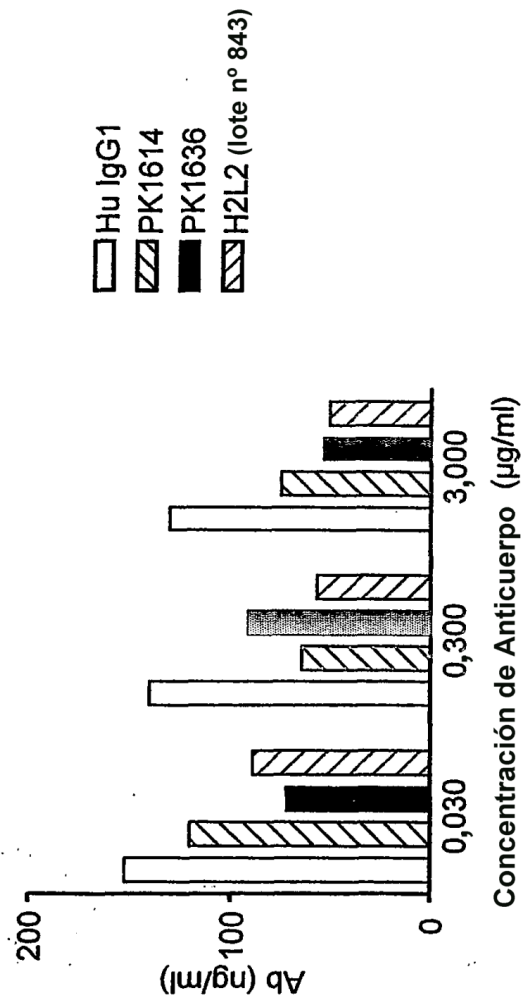


FIG. 10

10D5vh.pro	M D - R L T S S F L L L I V P A Y V L S Q A T L K E S G P G	10	20	30	29
3D6vh.PRO	M N F G L S L I F L V L V L K G - V Q C E V K L V E S G G G				29
10D5vh.pro	I L Q S S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V S W I R	40	50	60	59
3D6vh.PRO	L V K P G A S L K L S C A A S G F T F S N Y G M - - S W V R				57
10D5vh.pro	Q P S G K G L E W L A H I Y W D D D K R Y - N P S L K S R L	70	80	90	88
3D6vh.PRO	Q N S D K R L E W V A S I R S G G G R T Y Y S D N V K G R F				87
10D5vh.pro	T I S K D T S R K Q V F L K I T S V D P A D T A T Y Y C V R	100	110	120	118
3D6vh.PRO	T I S R E N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A L Y Y C V R				117
10D5vh.pro	R P I T P V L V D A M D Y W G Q G T S V T V S S	130	140		142
3D6vh.PRO	- - - Y D H Y S G S S D Y W G Q G T V T V S S				138