



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 401**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/567** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02766022 .4**

86 Fecha de presentación : **16.08.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1416965**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Método de ensayo para la enfermedad de Alzheimer.**

30 Prioridad: **17.08.2001 US 313221 P**  
**17.08.2001 US 313224 P**  
**23.10.2001 US 334987 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2008**

73 Titular/es: **Washington University**  
**One Brookings Drive**  
**St. Louis, Missouri 63110, US**  
**ELI LILLY AND COMPANY**

72 Inventor/es: **Holtzman, David, M.;**  
**Demattos, Ronald;**  
**Bales, Kelly, R.;**  
**Cummins, David, J. y**  
**Paul, Steven, M.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Método de ensayo para la enfermedad de Alzheimer.

5 **Campo de la técnica**

La invención se refiere a un ensayo que permite el diagnóstico preclínico y clínico de la enfermedad de Alzheimer. El ensayo se basa en la evaluación de los niveles del péptido beta-amiloide ( $A\beta$ ) en el plasma después de la administración de ciertos anticuerpos anti- $A\beta$  a un sujeto.

10 **Antecedentes de la técnica**

Un número de patologías que causan déficits cognoscitivos, aplopejías, hemorragias cerebrales y una debilitación general mental parecen estar asociadas a las placas neuríticas y cerebrovasculares en el cerebro que contiene el péptido beta-amiloide ( $A\beta$ ). Entre estas condiciones están tanto la enfermedad de Alzheimer preclínica como clínica, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral (AAC) preclínica y clínica. Las placas amiloides están formadas de péptidos beta amiloides. Estos péptidos circulan por la sangre y por el fluido cerebroespinal (FCE). El péptido  $A\beta$  en la forma circulante está compuesto de 39-43 aminoácidos (en su mayoría 40 ó 42 aminoácidos) causando la división de una proteína precursora común, la proteína precursora del amiloide, denominada comúnmente APP.

Hay pruebas que sugieren que  $A\beta$  puede ser transportado de un lado a otro entre el cerebro y la sangre (Ghersi-Egea, J-F., *et al.*, *J. Neurochem.* (1996) **67**: 880-883; Zlokovic, B. V., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1993) **67**: 1034-1040; Shibata, M., *et al.*, *J. Clin. Invest.* (2000) **106**:1489-1499. Además el  $A\beta$  en las placas está en equilibrio con el  $A\beta$  soluble en el cerebro y la sangre (Kawarabayashi, T., *et al.*, *J. Neurosci.* (2001) **21**:372-381), DeMattos *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA* (2001) **98**: 8850-8855.

Como se describe en el documento WO01/4987, los niveles circulantes totales del péptido  $A\beta$  en el FCE son similares en individuos normales e individuos predispuestos a exhibir los síntomas del Alzheimer. Sin embargo, los niveles de  $A\beta_{42}$  son inferiores por regla general en individuos con la enfermedad de Alzheimer (Nitsch, R. M., *et al.*, *Ann. Neurol.* (1995) **37**:512-518). Se sabe que el  $A\beta_{42}$  es más propenso a agregarse que el  $A\beta_{40}$ , y que cuando esto resulta, se producen consecuencias adversas tales como la deposición de  $A\beta$  en placas amiloides, la conversión de  $A\beta$  en formas tóxicas, daño neuronal e impedimentos conductuales tales como la demencia (Golde, T. E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* (2000) **1502**: 172-187).

El documento WO01/62801 titulado "Humanized Antibodies That Sequester  $A\beta$  Peptide", presentado el 26 de febrero de 2001, describe anticuerpos que no cruzan apreciablemente la barrera sangre-cerebro y que secuestran péptidos  $A\beta$  circulantes en fluidos biológicos. Estos anticuerpos han sido descritos como útiles para el tratamiento preventivo y terapéutico de condiciones asociadas con la formación de placas que contienen  $A\beta$  difusas, neuríticas y cerebrovasculares en el cerebro. La solicitud describe la administración de los anticuerpos y luego la medición de los niveles circulantes del péptido  $A\beta$  en la sangre para evaluar el progreso de la terapia. No hay ninguna sugerencia clara, a pesar de que los niveles del péptido  $A\beta$  después de la administración de los anticuerpos son diagnósticos de la condición por sí mismos. La presente invención se basa en el resultado sorprendente de que los mayores niveles tanto de  $A\beta_{40}$  como de  $A\beta_{42}$  así como la relación  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  tienen correlación con los niveles de deposición del péptido  $A\beta$  en el cerebro cuando los anticuerpos han sido administrados a un individuo. Así, la medida de estos componentes en la sangre después de la administración del anticuerpo proporciona un ensayo diagnóstico directo tanto para la enfermedad de Alzheimer clínica y preclínica y los trastornos neurológicos relacionados.

Hay publicaciones relevantes adicionales acerca del comportamiento de los anticuerpos del péptido  $A\beta$ . Por ejemplo, la publicación PCT WO99/27944 publicada el 10 de junio de 1999 describe métodos para inducir una respuesta inmune que reducen los depósitos amiloides. La publicación N°. W099/60024, publicada el 25 de noviembre de 1999, describe métodos para la eliminación del amiloide usando anticuerpos antiamiloides. Publicaciones PCT adicionales, incluyendo WO00/72880, WO00/72876 y WO00/77178 todas describen varias actividades de anticuerpos del péptido anti- $A\beta$ . Los anticuerpos dirigidos al extremo N-terminal de este péptido, según se cree, reducen las placas en un modelo murino transgénico; la inmunización con el amiloide por sí mismos es descrita según los anticuerpos son diseñados para catalizar la hidrólisis del péptido.

Se ha demostrado que una ruta para el metabolismo de  $A\beta$  es vía el transporte desde el SNC al plasma (Zlokovic, B. V., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1996) **93**: 4229-4234; Ghersi-Egea, J-F., *et al.*, *J. Neurochem.* (1996) **67**: 880-883). Además, se ha demostrado que  $A\beta$  en el plasma puede cruzar la barrera sangre-cerebro y entrar en el cerebro (Zlokovic, B. V., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1993) **67**: 1034-1040). También se ha demostrado que la administración de ciertos anticuerpos de  $A\beta$  policlonales y monoclonales disminuyen la deposición de  $A\beta$  en las placas amiloides en el modelo de ratón transgénico APP<sup>V717F</sup> de la enfermedad de Alzheimer (Bard, F., *et al.*, *Nature Med.* (2000) **6**: 916-919). Esto, como se decía, era debido a ciertos anticuerpos anti- $A\beta$  que cruzan la barrera sangre-cerebro y a la estimulación de la fagocitosis de las placas amiloides por las células microgliales. En los experimentos de Bard, ensayos de cortes cerebrales *ex vivo* mostraron que la presencia del anticuerpo de  $A\beta$  añadido, con microglia exógenamente añadida, inducía la fagocitosis de  $A\beta$  causando la eliminación de los depósitos de  $A\beta$ .

Los niveles tanto de  $A\beta_{40}$  soluble como de  $A\beta_{42}$  en FCE y sangre pueden ser detectados fácilmente usando ensayos estandarizados usando anticuerpos dirigidos contra epítomos a lo largo de la cadena de  $A\beta$ . Tales ensayos han sido mencionados, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 5.766.846, 5.837.672 y 5.593.846. Estas patentes describen la producción de anticuerpos monoclonales murinos al dominio central del péptido  $A\beta$ , y se ha publicado que tenían epítomos alrededor y que incluían las posiciones 16 y 17. También se han descrito anticuerpos dirigidos contra la región del extremo N-terminal. Varios anticuerpos monoclonales fueron evaluados que inmunorreaccionaban con las posiciones 13-28 del péptido  $A\beta$ ; estos no se unieron a un péptido que representaba las posiciones 17-28, así, de acuerdo con las patentes citadas, estableciendo que esto es esta región, incluyendo las posiciones 16-17 (el sitio de  $\alpha$ -secretasa) la que era el objetivo de estos anticuerpos. Entre los anticuerpos conocidos que se unen entre los aminoácidos 13 y 28 de  $A\beta$  están los anticuerpos 266 de ratón (m266), 4G8 y 1C2.

### Descripción de la invención

Ahora se ha encontrado que los anticuerpos que son útiles para realizar los ensayos para el péptido  $A\beta$ , y que son útiles en el tratamiento de condiciones asociadas con placas amiloides en el cerebro pueden producir una respuesta que causa un aumento marcado del nivel del péptido  $A\beta$  en sangre y que este nivel puede ser usado como marcador diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer clínica y preclínica. Estos anticuerpos, que pueden o no pueden ser humanizados, secuestran el péptido  $A\beta$  de su forma unida y circulante en la sangre y cambian el aclaramiento de las formas soluble y unida de  $A\beta$  en el sistema nervioso central y el plasma. Estos anticuerpos, y sus fragmentos, se unen específicamente a un epítipo entre los aminoácidos 13 y 28 de la molécula  $A\beta$ . El CDR de estos anticuerpos puede ser derivado a partir del anticuerpo monoclonal 266 de ratón (SEQ ID NO: 1 por SEQ ID NO: 6). Los anticuerpos útiles incluyen los anticuerpos y sus fragmentos, en los que las regiones variables tienen secuencias que comprenden el CDR del anticuerpo de ratón 266 y las secuencias marco humanas específicas (SEQ ID NO: 7 por SEQ ID NO: 10), en las que los anticuerpos conservan aproximadamente las propiedades de unión del anticuerpo de ratón y, tienen propiedades *in vitro* y *in vivo* funcionalmente equivalentes con el anticuerpo de ratón 266. Especialmente útiles son los anticuerpos humanizados y sus fragmentos, en los que la cadena ligera es SEQ ID NO: 11 y la cadena pesada es SEQ ID NO: 12.

Así en un aspecto, la invención se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica que comprende:

(a) medir uno o varios de:

(i) el nivel de  $A\beta_{40}$ ;

(ii) el nivel de  $A\beta_{42}$ ; o

(iii) la relación  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ ;

en una muestra de sangre de un sujeto obtenida en un intervalo de tiempo después de administrar a dicho sujeto una cantidad de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo contenido dentro de las posiciones 13-28 de  $A\beta$  o un anticuerpo que secuestra el péptido  $A\beta$  de su forma unida y circulante en la sangre y cambia el aclaramiento de las formas solubles y unidas de  $A\beta$  en el sistema nervioso central en el plasma, en el que dicha cantidad es eficaz para cambiar los niveles de los péptidos  $A\beta$  circulantes en la sangre de dicho sujeto cuando dicho sujeto está en una etapa preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer; y

(b) comparar el nivel de  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , o la relación de  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  en dicho sujeto con un valor de control de dichos niveles, en el que los niveles elevados de  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , o la relación de  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  en dicho sujeto comparado con los niveles de control o la relación identifica dicho sujeto como en una etapa preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer.

### Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 A, B y C son gráficos que muestran los niveles de  $A\beta_{40}$  (Figura 1A),  $A\beta_{42}$  (Figura 1B) y la relación  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  (Figura 1C) en plasma de ratones transgénicos antes de la administración del anticuerpo m266, y la carencia de correlación con los depósitos de  $A\beta$  en cerebro.

Las Figuras 2 A y B son gráficos que muestran a  $A\beta_{40}$  en plasma (Figura 2A) y la relación  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  en plasma (Figura 2B) en ratones transgénicos una hora después de la inyección del anticuerpo m266, y la correlación significativa con los depósitos de  $A\beta$  en cerebro.

Las Figuras 3 A, B y C son gráficos que muestran correlaciones significativas de los dos péptidos  $A\beta$  (Figuras 3A y 3B) y su relación (Figura 3C) con la deposición del péptido  $A\beta$  en el cerebro 24 horas después de la inyección con el anticuerpo monoclonal m266.

Las Figuras 4 A, B y C son gráficos que muestran correlaciones significativas de las velocidades de entrada en la circulación de los dos péptidos  $A\beta$  (Figuras 4A y 4B) y su relación (Figura 4C) y la deposición del péptido  $A\beta$  en ratones transgénicos.

Las Figuras 5 A y B son gráficos que muestran una representación gráfica alternativa de los niveles de  $A\beta_{40}$  en el plasma 24 horas (Figura 5A) y 1 hora (Figura 5B) después de la inyección de m266 correlacionado con el porcentaje de hipocampo revestido por los depósitos de  $A\beta$ .

- 5 La Figura 6 es una tabla que muestra los coeficientes de correlación de Pearson (Pearson r) y la significación (el valor P) determinados entre los valores de  $A\beta$  en plasma (antes y después de la inyección de m266) y  $A\beta$  hipocámpico o carga amiloide.

### Modos para llevar a cabo la invención

10

Los péptidos  $A\beta$  que circulan en fluidos biológicos humanos representan una región carboxi terminal de una proteína precursora codificada en el cromosoma 21. Se ha publicado a partir de los resultados de experimentos *in vitro* que el péptido  $A\beta$  tiene una solubilidad pobre en soluciones fisiológicas, ya que este contiene una extensión de los aminoácidos hidrófobos que son una parte de la región que ancla a su precursor más largo a las membranas lipídicas de las células. No es por eso sorprendente que el péptido  $A\beta$  circulante normalmente esté complejoado con otros restos que le impiden agregarse. Esto ha causado dificultades en la detección del péptido  $A\beta$  circulante en fluidos biológicos.

15

Los documentos de patente anteriormente mencionados (patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 5.766.846, 5.837.672 y 5.593.846) describen la preparación de anticuerpos, incluyendo un anticuerpo monoclonal, denominado clon 266 (m266), que fue generado contra, y que se ha demostrado que se le une específicamente, un péptido que comprende los aminoácidos 13-28 del péptido  $A\beta$ . Los solicitantes han encontrado que después de la administración de m266 a ratones APP<sup>V717F</sup>, un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer, se puede medir los niveles de los péptidos  $A\beta$  en circulación que son diagnósticos de los niveles de placas amiloides en el cerebro. Así, estos anticuerpos son útiles no sólo para llevar a cabo ensayos para péptidos  $A\beta$  circulantes en sí, sino que también para producir los niveles circulan-  
25 tes en sangre que son diagnósticos de la cantidad de placas amiloides en el cerebro, y así son útiles en identificar a individuos en las etapas clínicas y preclínicas de la enfermedad de Alzheimer. Un tal anticuerpo, m266, se une a la región media del péptido  $A\beta$ .

30 Por "anticuerpo monoclonal que se une a la región media del péptido  $A\beta$ " se entiende un anticuerpo monoclonal (Mab o Mabs) que se une a una secuencia de aminoácidos que representa un epítipo contenido entre las posiciones 13-28 de  $A\beta$ . La región entera no tiene que ser reconocida. Siempre que el anticuerpo se una al menos a un epítipo dentro de esta región (especialmente, por ejemplo, incluyendo el sitio de  $\alpha$ -secretasa 16-17 o el sitio al cual el anticuerpo 266 se una), tales anticuerpos son eficaces en el método de la invención.

35

Por "anticuerpo" se entiende un anticuerpo monoclonal en sí, o uno de sus fragmentos inmunológicamente eficaces, tales como sus fragmentos  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$  o  $F_{(ab')_2}$ . En algunos contextos, en este documento, los fragmentos serán mencionados específicamente con énfasis; sin embargo, será entendido que independientemente de si los fragmentos son especificados, el término "anticuerpo" incluye tales fragmentos así como las formas de cadena simple. Siempre que la proteína conserve la capacidad de unirse específicamente a su objetivo pretendido, y en este caso, secuestre el péptido  $A\beta$  de sus proteínas de vehículo en la sangre, está incluido dentro del término "anticuerpo". También se incluyen dentro de la definición "anticuerpo" por ejemplo, las formas de cadena simple, generalmente denominadas regiones  $F_v$ , de anticuerpos con esta especificidad. Preferiblemente, pero no necesariamente, los anticuerpos útiles en la invención son producidos recombinantemente, según se requiera la manipulación de los anticuerpos típicamente murinos u otros no humanos con la especificidad apropiada para convertirlos en la forma humanizada. Los anticuerpos pueden o no ser glicosilados, aunque sean preferidos los anticuerpos glicosilados. Los anticuerpos son correctamente reticulados vía los puentes disulfuro, como es conocido.

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

55

Las cadenas ligeras son clasificadas como gamma, mu, alfa y lambda. Las cadenas pesadas son clasificadas como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más.

60

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Así, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de las regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por las regiones marco, permitiéndose la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N-terminal al C-terminal, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es conforme a las convenciones conocidas [Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest"

65

National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991; Chothia, *et al.*, *J. Mol. Bio.* (1987) **196**: 901-917; Chothia, *et al.*, *Nature* (1989) **342**: 878-883].

Como es bien conocido en la técnica, pueden ser generados anticuerpos monoclonales fácilmente con la especificidad apropiada mediante técnicas estándar de inmunización de mamíferos, formando hibridomas a partir de células que producen anticuerpos de dichos mamíferos o de otra manera inmortalizándolos, y cultivando los hibridomas o las células inmortalizadas para evaluarlos por la especificidad apropiada. En este caso, tales anticuerpos podrían ser generados inmunizando a un ser humano, conejo, rata o ratón, por ejemplo, con un péptido que representa un epítipo que abarca la región 13-28 del péptido A $\beta$  o su sub-región apropiada. Los materiales para la manipulación recombinante pueden ser obtenidos recuperando las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo deseado a partir del hibridoma u otra célula que lo produzca. Estas secuencias de nucleótidos entonces pueden ser manipuladas para proporcionarlos en forma humanizada, de ser deseado.

Puede ser deseable utilizar las formas humanizadas de estos anticuerpos para proporcionar los niveles circulantes deseados de los péptidos en sujetos humanos. Ya que la administración es a corto plazo y sólo con objetivos diagnósticos, esto puede no ser necesario, pero es claramente preferible evitar cualquier posibilidad de una respuesta inmune, por eso el uso de formas humanizadas es preferido. Por supuesto, para la realización del ensayo de los niveles de A $\beta$  *ex vivo* (por ejemplo, por ELISA), pueden ser usadas formas murinas por sí mismas.

Por "anticuerpo humanizado" se entiende un anticuerpo que está compuesto parcialmente o totalmente de secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de anticuerpo humano cambiando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas. La alteración más simple puede consistir simplemente en sustituir la región constante de un anticuerpo humano para la región constante murina, causando así una quimera humana/murina que puede tener una inmunogenicidad suficientemente baja para ser aceptable para su uso farmacéutico. Preferiblemente, sin embargo, la región variable del anticuerpo y hasta la CDR también es humanizada por técnicas que son conocidas en la técnica por ahora. Las regiones marco de las regiones variables son sustituidas por las regiones marco humanas correspondientes dejando la CDR no humana sustancialmente intacta, o hasta sustituyendo la CDR con secuencias derivadas de un genoma humano. Anticuerpos totalmente humanos son producidos en ratones genéticamente modificados cuyos sistemas inmunológicos han sido modificados para corresponder a sistemas inmunológicos humanos. Como se menciona anteriormente, es suficiente para su uso en los métodos de la invención emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo los fragmentos que representan las formas de cadena simple.

Un anticuerpo humanizado así se refiere a un anticuerpo que comprende un marco humano, al menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en el cual cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente el 85-90%, preferiblemente al menos el 95% es idéntica. A partir de ahí, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o varias secuencias de inmunoglobulina humanas naturales. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada típicamente no abarcaría un anticuerpo quimérico de región constante humana/región variable de ratón.

El diseño de inmunoglobulinas humanizadas puede ser llevado a cabo como sigue. Cuando un aminoácido cae bajo la categoría siguiente, el aminoácido de marco de una inmunoglobulina humana que se use (inmunoglobulina aceptadora) es sustituido por un aminoácido de marco de una inmunoglobulina no humana que proporcione CDR (inmunoglobulina donadora): (a) el aminoácido en la región marco humana de la inmunoglobulina aceptadora es inusual para la inmunoglobulina humana en aquella posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es típico para la inmunoglobulina humana en aquella posición; (b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o (c) cualquier átomo de la cadena lateral de un aminoácido de marco está dentro de aproximadamente 5-6 ángstroms (de-centro-a-centro) de cualquier átomo de un aminoácido de CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional [Queen, *et al.*, *op. cit.*, y Co, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) **88**:2869]. Cuando cada uno del aminoácido en la región de marco humana de la inmunoglobulina aceptadora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es inusual para la inmunoglobulina humana en aquella posición, tal aminoácido es sustituido por un aminoácido típico para la inmunoglobulina humana en aquella posición.

Un anticuerpo humanizado preferido es una forma humanizada del anticuerpo de ratón 266. Las CDR de 266 humanizados tienen las secuencias de aminoácidos siguientes:

CDR1 de cadena ligera:

1	5	10	15
Arg	Ser	Ser	Gln
Ser	Leu	Ile	Tyr
Ser	Asp	Gly	Asn
Ala	Tyr	Leu	His

(SEQ ID NO:1)

## ES 2 295 401 T3

CDR2 de cadena ligera:

1 5  
5 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (SEQ ID NO:2)

CDR3 de cadena ligera:

10 1 5  
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr (SEQ ID NO:3)

CDR1 de cadena pesada:

15 1 5  
Arg Tyr Ser Met Ser (SEQ ID NO:4)

CDR2 de cadena pesada:

25 1 5 10 15  
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly  
(SEQ ID NO:5)

y, CDR3 de cadena pesada:

30 1  
Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6).

35 Una región variable de cadena ligera preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el marco es originado a partir de los segmentos Vk de la línea germinal humana DPK18 y el segmento de J Jkl, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos consenso en el mismo subgrupo V humano para reducir la inmunogenicidad potencial:

40 1 5 10 15  
Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa  
45 20 25 30  
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa  
35 40 45  
50 Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro  
50 55 60  
Gly Gln Ser Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe  
55 65 70 75  
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
80 85 90  
60 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val  
95 100 105  
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa  
65 110  
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:7)

## ES 2 295 401 T3

en el que:

Xaa en la posición 2 es Val o Ile;

5 Xaa en la posición 7 es Ser o Thr;

Xaa en la posición 14 es Thr o Ser;

10 Xaa en la posición 15 es Leu o Pro;

Xaa en la posición 30 es Ile o Val;

Xaa en la posición 50 es Arg, Gln o Lys;

15 Xaa en la posición 88 es Val o Leu;

Xaa en la posición 105 es Gln o Gly;

20 Xaa en la posición 108 es Lys o Arg; y

Xaa en la posición 109 es Val o Leu.

25 Una región variable de cadena pesada preferida de un anticuerpo humanizado tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el marco es originado a partir de los segmentos de VH de la línea germinal humana DP53 y el segmento de J JH4, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos consenso en el mismo subgrupo humano para reducir la inmunogenicidad potencial:

30	1	5	10	15
	Xaa	Val	Gln	Leu
	Val	Glu	Xaa	Gly
	Gly	Gly	Gly	Leu
	Val	Gln	Pro	Gly
	20	25	30	
	Gly	Ser	Leu	Arg
	Leu	Ser	Cys	Ala
	Ala	Ser	Gly	Phe
	Thr	Phe	Ser	
35	35	40	45	
	Arg	Tyr	Ser	Met
	Ser	Trp	Val	Arg
	Gln	Ala	Pro	Gly
	Lys	Gly	Leu	
40	50	55	60	
	Xaa	Leu	Val	Ala
	Gln	Ile	Asn	Ser
	Val	Gly	Asn	Ser
	Thr	Tyr	Tyr	
	65	70	75	
	Pro	Asp	Xaa	Val
	Lys	Gly	Arg	Phe
	Thr	Ile	Ser	Arg
	Asp	Asn	Xaa	
45	80	85	90	
	Xaa	Asn	Thr	Leu
	Tyr	Leu	Gln	Met
	Asn	Ser	Leu	Arg
	Ala	Xaa	Asp	
50	95	100	105	
	Thr	Ala	Val	Tyr
	Tyr	Cys	Ala	Ser
	Gly	Asp	Tyr	Trp
	Gly	Gln	Gly	
	110			
	Thr	Xaa	Val	Thr
	Val	Ser	Ser	(SEQ ID NO:8)

55 en el que:

Xaa en la posición 1 es Glu o Gln;

Xaa en la posición 7 es Ser o Leu;

60 Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser;

Xaa en la posición 63 es Thr o Ser;

65 Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val, o Thr;

Xaa en la posición 76 es Lys o Arg;

## ES 2 295 401 T3

Xaa en la posición 89 es Glu o Asp; y

Xaa en la posición 107 es Leu o Thr.

- 5 Una región variable de cadena ligera particularmente preferida de un anticuerpo humanizado tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el marco es originado a partir de los segmentos de Vk de la línea germinal humana DPK18 y el segmento de J Jkl, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos consenso en el mismo subgrupo de V humano para reducir la inmunogenicidad potencial:

```

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

      20           25           30
15      Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile

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

20      50           55           60
      Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

      65           70           75
25      Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

      80           85           90
      Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

30      95           100          105
      Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

      110
35      Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:9) .

```

Una región variable de cadena pesada particularmente preferida de un anticuerpo humanizado tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el marco es originado a partir de los segmentos VH de la línea germinal humana DP53 y el segmento de J JH4:

```

40      1           5           10           15
      Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

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

      35           40           45
      Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50      50           55           60
      Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr

      65           70           75
55      Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

      80           85           90
60      Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

      95           100          105
      Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

65      110
      Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:10) .

```



# ES 2 295 401 T3

Una cadena ligera preferida para un anticuerpo humanizado tiene la secuencia de aminoácidos:

5	1	5	10	15
	Asp	Val	Val	Met
	Thr	Gln	Ser	Pro
	Leu	Ser	Leu	Pro
	Val	Thr	Leu	
	20	25	30	
	Gly	Gln	Pro	Ala
	Ser	Ile	Ser	Cys
	Arg	Ser	Ser	Gln
	Ser	Leu	Ile	
10	35	40	45	
	Tyr	Ser	Asp	Gly
	Asn	Ala	Tyr	Leu
	His	Trp	Phe	Leu
	Gln	Lys	Pro	
	50	55	60	
	Gly	Gln	Ser	Pro
	Arg	Leu	Leu	Ile
	Tyr	Lys	Val	Ser
	Asn	Arg	Phe	
	65	70	75	
	Ser	Gly	Val	Pro
	Asp	Arg	Phe	Ser
	Gly	Ser	Gly	Thr
	Asp			
20	80	85	90	
	Phe	Thr	Leu	Lys
	Ile	Ser	Arg	Val
	Glu	Ala	Glu	Asp
	Val	Gly	Val	
	95	100	105	
	Tyr	Tyr	Cys	Ser
	Gln	Ser	Thr	His
	Val	Pro	Trp	Thr
	Phe	Gly	Gln	
	110	115	120	
	Gly	Thr	Lys	Val
	Glu	Ile	Lys	Arg
	Thr	Val	Ala	Ala
	Pro	Ser	Val	
30	125	130	135	
	Phe	Ile	Phe	Pro
	Pro	Ser	Asp	Glu
	Gln	Leu	Lys	Ser
	Gly	Thr	Ala	
	140	145	150	
	Ser	Val	Val	Cys
	Leu	Leu	Asn	Asn
	Phe	Tyr	Pro	Arg
	Glu	Ala	Lys	
	155	160	165	
	Val	Gln	Trp	Lys
	Val	Asp	Asn	Ala
	Leu	Gln	Ser	Gly
	Asn	Ser	Gln	
40	170	175	180	
	Glu	Ser	Val	Thr
	Glu	Gln	Asp	Ser
	Lys	Asp	Ser	Thr
	Tyr	Ser	Leu	
	185	190	195	
	Ser	Ser	Thr	Leu
	Thr	Leu	Ser	Lys
	Ala	Asp	Tyr	Glu
	Lys	His	Lys	
	200	205	210	
	Val	Tyr	Ala	Cys
	Glu	Val	Thr	His
	Gln	Gly	Leu	Ser
	Ser	Pro	Val	
	215			
	Thr	Lys	Ser	Phe
	Asn	Arg	Gly	Glu
	Cys	(SEQ ID NO:11)		

# ES 2 295 401 T3

Una cadena pesada preferida para un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos:

5	1	5	10	15
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
10	20	25	30	
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
15	35	40	45	
	Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
20	50	55	60	
	Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr			
25	65	70	75	
	Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala			
30	80	85	90	
	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
35	95	100	105	
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
40	110	115	120	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
45	125	130	135	
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
50	140	145	150	
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
55	155	160	165	
	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
60	170	175	180	
	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
65	185	190	195	
	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
	200	205	210	
	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
	215	220	225	
	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			

# ES 2 295 401 T3

		230		235		240
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
5		245		250		255
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
		260		265		270
10	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
		275		280		285
	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
15		290		295		300
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
		305		310		315
20	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
		320		325		330
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
25		335		340		345
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
		350		355		360
30	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
		365		370		375
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
		380		385		390
35	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
		395		400		405
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
40		410		415		420
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
		425		430		435
45	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
		440				
50	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly Lys (SEQ ID NO:12)

Otras secuencias son posibles para las cadenas ligeras y pesadas para los anticuerpos humanizados y para los 266 humanizados. Las inmunoglobulinas puede tener dos pares de complejos de cadena pesada/cadena ligera, comprendiendo al menos una cadena una o varias regiones determinantes de la complementariedad de ratón funcionalmente unidas a segmentos de región marco humanos.

Comenzando en la posición 56 de la región variable de cadena pesada, tanto m266 como 266 humanizado contienen la secuencia Asn-Ser-Thr. Esta secuencia es un ejemplo de la señal de Asn-X-Ser/Thr para la glicosilación N-unida, en la que el Asn es el sitio de unión de las cadenas de glicosilo N-unidas. Tanto m266 como 266 humanizado están extensivamente glicosilados en este sitio. Muy impredecible y ventajosamente, la afinidad del 266 humanizado que está desglicosado en la CDR2 de cadena pesada para el péptido Aβ es notablemente más alta que la del 266 humanizado. La CDR2 de cadena pesada del 266 desglicosado humanizado tiene las secuencias de aminoácidos siguientes:

## ES 2 295 401 T3

CDR2 de cadena pesada:

5                   1                   5                   10                   15  
           **Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly**  
           **(SEQ ID NO:13)**

en la que:

10       Xaa en la posición 7 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 8 no es ninguno Asp ni Pro y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 7 no es Asn;

      Xaa en la posición 8 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 8 es Asp o Pro; y

15       Xaa en la posición 9 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 8 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 9 no es ni Ser ni Thr;

20       Por “cualquier aminoácido” se entiende cualquier aminoácido que ocurre naturalmente. Los aminoácidos que ocurren naturalmente preferidos son Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr.

      Un anticuerpo humanizado desglicosado preferido es una forma humanizada de m266, en la que el CDR2 de cadena pesada desglicosado es SEQ ID NO: 13, en el que:

25       Xaa en la posición 7 de SEQ ID NO: 13 es seleccionado a partir del grupo que consiste en Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr, con tal de que si Xaa en la posición 8 no es ni Asp ni Pro y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 7 no es Asn;

30       Xaa en la posición 8 de SEQ ID NO: 13 es seleccionado a partir del grupo que consiste en Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr, con tal de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 8 es Asp o Pro;

35       Xaa en la posición 9 de SEQ ID NO: 13 es seleccionado a partir del grupo que consiste en Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, y Tyr, con tal de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 8 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 9 no es ni Ser ni Thr.

40       Una región variable de cadena pesada preferida de un anticuerpo humanizado desglicosado tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el marco es originado a partir del segmento de VH de la línea germinal humana DP53 y el segmento de J JH4, con varias sustituciones de aminoácido en los aminoácidos consenso en el mismo subgrupo humano para reducir la inmunogenicidad potencial y en la que el sitio de N-glicosilación en la CDR2 de cadena pesada es modificado de modo que no pueda ser N-glicosilado:

45                   1                   5                   10                   15  
           **Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly**  
                                   20                   25                   30  
           **Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser**  
 50                   35                   40                   45  
           **Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu**  
                                   50                   55                   60  
           **Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr**  
 55                   65                   70                   75  
           **Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa**  
                                   80                   85                   90  
 60           **Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp**  
                                   95                   100                   105  
           **Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly**  
 65                   110  
           **Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser**                                   **(SEQ ID NO:14)**

## ES 2 295 401 T3

en el que:

Xaa en la posición 1 es Glu o Gln;

5 Xaa en la posición 7 es Ser o Leu;

Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser;

10 Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn;

Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro; y

15 Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es ni Ser ni Thr;

Xaa en la posición 63 es Thr o Ser;

20 Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val o Thr;

Xaa en la posición 76 es Lys o Arg;

Xaa en la posición 89 es Glu o Asp; y

25 Xaa en la posición 107 es Leu o Thr.

30 Una región variable de cadena pesada particularmente preferida de un anticuerpo desglicosado humanizado tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la cual el marco es originado a partir del segmento VH de la línea germinal humana DP53 y el segmento de J JH4 y en el que el sitio de N-glicosilación en la CDR2 de cadena pesada es modificado de modo que no pueda ser N-glicosilado:

35	1	5	10	15
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
	20	25	30	
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
40	35	40	45	
	Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
45	50	55	60	
	Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr			
	65	70	75	
	Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala			
50	80	85	90	
	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
55	95	100	105	
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
60	110			
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			(SEQ ID NO:15)

en el que:

65 Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn;

## ES 2 295 401 T3

Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro; y

5 Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es ni Ser ni Thr.

Una cadena pesada preferida para un anticuerpo humanizado desglicosado, en el que el sitio de N-glicosilación en la CDR2 de cadena pesada es modificado de modo que no pueda ser N-glicosilado, tiene la secuencia de amino-ácidos:

```

10
      1           5           10           15
    Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
15
      20           25           30
    Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20
      35           40           45
    Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
25
      50           55           60
    Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr
30
      65           70           75
    Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
35
      80           85           90
    Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
40
      95           100          105
    Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
45
      110          115          120
    Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
50
      125          130          135

```

# ES 2 295 401 T3

	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
					140						145				150
5	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
					155						160				165
	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
10					170						175				180
	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
					185						190				195
15	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
					200						205				210
	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
20					215						220				225
	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
					230						235				240
25	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
					245						250				255
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
30					260						265				270
	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
					275						280				285
35	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
					290						295				300
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
40					305						310				315
	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
					320						325				330
45	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
					335						340				345
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
50					350						355				360
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
					365						370				375
55	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
					380						385				390
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
60					395						400				405
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
					410						415				420
65	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys

## ES 2 295 401 T3

425
430
435  
**Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser**  
  
440
(SEQ ID NO:16)  
**Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys**

en el que:

10 Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn;

15 Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro; y

15 Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es ni Ser ni Thr.

20 Los anticuerpos de 266 desglicosados preferidos que tienen la región variable pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16 son aquellos en los que:

Xaa en la posición 56 es seleccionado a partir del grupo que consiste en Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser y Thr, con tal de que si Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn;

25 Xaa en la posición 57 es seleccionado a partir del grupo que consiste en Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser y Thr; y

Xaa en la posición 58 es seleccionado a partir del grupo que consiste en Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser y Thr, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn, entonces Xaa en la posición 58 no es ni Ser ni Thr.

30 Las secuencias preferidas para CDR2 (posiciones 56, 57 y 58) de la cadena pesada SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16 incluyen aquellas en las cuales sólo un aminoácido simple es cambiado, aquellas en las cuales sólo dos aminoácidos son cambiados, o todos los tres son cambiados. Es preferido sustituir Asn en la posición 56. Es preferido sustituir Thr en la posición 58 con un aminoácido distinto a Ser. Es preferido no destruir el sitio de N-glicosilación en la CDR2 de la cadena pesada de 266 sustituyendo Ser en la posición 57 con Pro o Asp. Sustituciones conservadoras en las posiciones uno, dos o tres son las preferidas. Las especies más preferidas son aquellas en las cuales Asn en la posición 56 es sustituida por Ser o Thr. Los anticuerpos particularmente preferidos son aquellos en los cuales Ser o Thr están en la posición 56, Ser está en la posición 57, y Thr está en la posición 58 de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

40 Las especies desglicosadas especialmente preferidas son los anticuerpos que comprenden una cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada de SEQ ID NO: 16, en la que en SEQ ID NO: 16, Xaa en la posición 56 es Ser, Xaa en la posición 57 es Ser, y Xaa en la posición 58 es Thr ("N56S"), o en la que en SEQ ID NO: 16, Xaa en la posición 56 es Thr, Xaa en la posición 57 es Ser, y Xaa en la posición 58 es Thr ("N56T").

45 La producción de los anticuerpos útiles en la invención típicamente implica técnicas recombinantes, como se describe en el documento WO01/62801 citado anteriormente.

50 Los anticuerpos (incluyendo los fragmentos inmunológicamente reactivos) son administrados a un sujeto que se evalúa en condiciones asociadas con depósitos de Aβ tales como la enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica, o angiopatía amiloide clínica o preclínica, usando técnicas de administración estándar, preferiblemente periféricamente (es decir no por administración en el sistema nervioso central) por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o con supositorios.

55 Las composiciones para la administración son diseñadas para ser apropiadas en el modo seleccionado de administración, y excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de dispersión, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares son usados cuando sea apropiado. La última edición del Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA proporciona un compendio de técnicas de formulación como son generalmente conocidas para los médicos. Puede ser particularmente útil cambiar las características de solubilidad de los anticuerpos que haciéndolos más lipófilos, por ejemplo, encapsulándolos en liposomas o bloqueando los grupos polares.

60 La administración sistémica periférica por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea es preferida. Los vehículos adecuados para tales inyecciones son directos. Además, sin embargo, la administración puede ser efectuada también a través de las membranas mucosas mediante aerosoles nasales o supositorios. Formulaciones adecuadas para tales modos de administración son conocidas e incluyen típicamente los tensioactivos que facilitan la transferencia para cruzar la membrana. Tales tensioactivos son derivados a menudo a partir de esteroides o son lípidos catiónicos, tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N,N,N-trimetil-amonio (DOTMA) o varios compuestos tales como colesterohemisuccinato, fosfatidilglicerol y otros similares.



La concentración del anticuerpo humanizado en formulaciones es tan baja como de aproximadamente el 0,1% a tan alta como 15 o 20% en peso y será seleccionada principalmente basado en los volúmenes del fluido, viscosidades, etcétera, etcétera, conforme al modo particular de administración seleccionado. Así, una composición típica para la inyección podría ser hecha para contener 1 mL de agua estéril tamponada de solución salina tamponada de fosfato y 1-1000 mg, preferiblemente 10-100 mg, del anticuerpo humanizado. La formulación podría ser filtrada en estéril después de la fabricación de la formulación, o de otra manera hacerse microbiológicamente aceptable. Una composición típica para la infusión intravenosa podría tener volúmenes entre 1-250 mL de fluido, como solución de Ringer estéril, y 1-100 mg por mL, o más en la concentración del anticuerpo. Los agentes terapéuticos pueden ser congelados o liofilizados para el almacenaje y ser reconstituidos en un vehículo estéril adecuado antes del uso. La liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de la pérdida de actividad del anticuerpo (por ejemplo, con globulinas inmunes convencionales, los anticuerpos de IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos de IgG). Las dosificaciones deberían ser ajustadas para compensar. El pH de la formulación será seleccionado para equilibrar la estabilidad del anticuerpo (química y física) y la comodidad al paciente cuando se le administre. Generalmente, el pH entre 4 y 8 es tolerado.

Aunque los métodos precedentes parezcan los más convenientes y en su mayor parte apropiados para la administración de proteínas tales como anticuerpos humanizados, mediante una adaptación adecuada, otras técnicas para la administración, tales como la administración transdérmica y la administración oral, pueden ser empleadas a condición de que la formulación apropiada sea diseñada.

Además, puede ser deseable emplear formulaciones de liberación controlada usando películas biodegradables y matrices, o minibombas osmóticas, o sistemas de suministro basados en perlas de dextrano, alginato o colágeno.

En resumen, hay formulaciones disponibles para administrar los anticuerpos y son conocidas en la técnica y pueden ser escogidas a partir de una variedad de opciones.

Los niveles de dosificación típicos pueden ser optimizados usando técnicas clínicas estándar y serán dependientes del modo de administración.

Después de la administración del anticuerpo al sujeto, las muestras de sangre son retiradas en intervalos periódicos en los sucesivos minutos, horas o días. Períodos de tiempo adecuados pueden ser tan cortos como unos minutos, 10 minutos, 30 minutos, o 1 hora, varias horas, o se puede permitir transcurrir días antes de la retirada de la muestra de sangre. La medida después de menos de 3 horas es preferida. De ser deseado, la fracción del plasma puede ser obtenida para su facilidad de análisis. Técnicas analíticas estándar para el análisis de  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  y su relación son usadas. Estas técnicas son descritas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N°. 5.766.846. Cualquier técnica adecuada para el análisis, sin embargo, puede ser empleada, como separación cromatográfica, inmunotransferencia, ensayos ELISA, ensayos homogéneos y otros por el estilo.

La concentración de  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , o su relación entonces es comparada con estos valores en un control. Los controles típicos incluyen a individuos conocidos que no tienen condiciones asociadas a placas amiloides, tales como adolescentes o adultos muy jóvenes y además, controles normales cognoscitivamente emparejados por edad son obtenidos haciendo un promedio de valores de la población general. Mientras que algunos controles normales cognoscitivamente emparejados por edad de ancianos tienen AD preclínica, la mayor parte no. Así, los valores promedios de tal población serán útiles y críticos para obtener. El diseño de controles estándar es un procedimiento que es conocido por el médico ordinario. Los individuos que tienen elevados niveles de los péptidos indicados o de la relación de  $A\beta_{40}$  a  $A\beta_{42}$  comparando con los valores de control entonces son identificados por tener una alta probabilidad de condiciones clínicas o preclínicas asociadas con la formación de placas amiloides.

Los ejemplos siguientes son requeridos para ilustrar, pero no para limitar la invención.

Los ejemplos siguientes en este documento emplean, entre otros, un anticuerpo monoclonal murino denominado "266" que fue preparado inicialmente por inmunización con un péptido comprendido a partir de los restos 13-28 del péptido  $A\beta$  humano. Se confirmó que el anticuerpo inmuno-reacciona con este péptido, pero como se ha mencionado antes, no reaccionaba con el péptido que contiene sólo los restos 17-28 del péptido humano  $A\beta$ , o en cualquier otro epítipo dentro del péptido  $A\beta$ . La preparación de este anticuerpo es descrita en la patente de EE.UU. N°. 5.766.846. Como los ejemplos en este documento describen experimentos conducidos en sistemas murinos, el uso de anticuerpos monoclonales murinos es satisfactorio. Sin embargo, las formas humanizadas de los anticuerpos con la inmunoespecificidad correspondiente a la del anticuerpo 266 son preferidas.

#### Ejemplo 1

##### *Correlación de los niveles de péptido circulantes con placas*

Un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer, ratones transgénicos APP V717F, fue usado en este ensayo. Estos ratones son descritos en Games, D., *et al.*, *Nature* (1995) **373**: 523-527; Bales, K. R., *et al.*, *Nature Genet.* (1997) **17**: 263-264; y en Holtzman, D. M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000) **97**: 2892-2897. En este modelo, una forma mutante del gen de APP humano es expresada y causa una forma de inicio precoz de la enfermedad de Alzheimer familiar. Aunque los cerebros de estos ratones parezcan normales al principio, la deposición de  $A\beta$  en la

forma de placas difusas y neuríticas ocurre a los 6-15 meses, aunque ratones homocigóticos para el transgen muestran una variabilidad porque a los 9-14 meses de edad, algunos ratones desarrollan depósitos de A $\beta$  mientras que otros no lo hacen.

5 Fueron usados en este estudio 53 ratones homocigóticos a los 12 meses.

Los niveles en plasma de A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$ , y las relaciones A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  fueron medidos por ELISA en el plasma de estos ratones antes de la administración de 500  $\mu$ g de m266 y en diversos intervalos de tiempo hasta 24 horas después de la administración de este anticuerpo. Después de 24 horas, los ratones fueron sacrificados, y la cantidad de deposición de A $\beta$  en el cerebro fue evaluada en el hipocampo y la corteza como se describe en DeMattos, *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA* (2001) **98**: 8850-8855, y se evaluaron como un porcentaje de cerebro revestido por los depósitos de A $\beta$ .

15 Como se muestra en las Figuras 1 A, B y C, si el porcentaje de revestimiento de A $\beta$  debido a la deposición en el hipocampo es representado en el eje de abscisas frente a los niveles de los péptidos y su relación en el plasma en el eje de ordenadas antes de la administración del anticuerpo, no se encuentra ninguna correlación. Independientemente de si el porcentaje de la deposición de A $\beta$  era esencialmente el cero (0) o más del 75%, el promedio del nivel de A $\beta_{40}$  era aproximadamente 250 (pg/ml) y de A $\beta_{42}$  aproximadamente 400 (pg/ml). La relación de A $\beta_{40}$  frente a A $\beta_{42}$  fue así de aproximadamente 0,5-0,6.

20 Como se muestra en las Figuras 2 A y B, sin embargo, el nivel en plasma de A $\beta_{40}$  estaba fuertemente correlacionado con el porcentaje de deposición A $\beta$  en el hipocampo una hora después de la inyección de m266, como hizo la relación de A $\beta_{40}$  a A $\beta_{42}$ .

25 Las Figuras 3 A, B y C muestran resultados similares obtenidos después de 24 horas de la inyección. Los niveles obtenidos de A $\beta_{40}$  y la relación A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  estaba fuertemente correlacionada con el % de deposición de A $\beta$  en el hipocampo. Los niveles de A $\beta_{42}$  también estaban correlacionados con el % de la deposición de A $\beta$ , pero no fue así con los niveles de A $\beta_{40}$ .

30 Las Figuras 4 A, B y C muestran resultados análogos en lo que concierne a la velocidad de entrada de los dos péptidos A $\beta$  en el plasma y los valores calculados para la velocidad de entrada como una función de la relación de estos péptidos. Las mejores correlaciones con la deposición de A $\beta$  fueron la velocidad de entrada de A $\beta_{40}$  y la relación de A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$ .

35 Las Figuras 5 A y B muestran una presentación alternativa de los datos para niveles plasma de A $\beta_{40}$  24 horas y 1 hora después de la inyección de m266. Cuando los ratones fueron agrupados de acuerdo con un revestimiento bajo, medio o alto de A $\beta$  en el hipocampo, los animales con una deposición de A $\beta$  baja pudieron ser completamente distinguidos de aquellos con una alta deposición como una función del nivel en plasma de A $\beta_{40}$ .

## 40 Ejemplo 2

En un estudio similar al expuesto antes en el Ejemplo 1, una cohorte de 49 ratones homocigóticos APP V717F fue usada. Antes y después de la inyección de 500  $\mu$ g IV de m266, fueron obtenidas muestras de plasma a los 5 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas y fueron evaluados los niveles de A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$  como se describe en el Ejemplo 1. Los ratones fueron sacrificados después de 24 horas y 1 hemisferio fue evaluado por el porcentaje del área del hipocampo o la corteza cingular ocupada por el péptido A $\beta$  (usando la tinción por inmunofluorescencia cuantitativa de A $\beta$ ) y el área ocupada por el amiloide (por la tinción de tioflavina-S (amiloide)). Las regiones del otro hemisferio fueron evaluadas para el péptido A $\beta$  mediante ELISA.

50 El coeficiente de correlación de Pearson (Pearson r) y la significación (el valor P) fueron determinados entre los valores de A $\beta$  en plasma (antes y después de la inyección de m266) y el A $\beta$  hipocámpico o la carga amiloide usando el software de Prism GraphPad (versión 3.00 para Windows, San Diego, EE.UU.). La carga de A $\beta$  es definida como el porcentaje del área del hipocampo revestida por depósitos de A $\beta$ -inmunorreactivos. La carga amiloide es definida como el porcentaje del área de hipocampo revestido por depósitos positivos de tioflavina-S. Las correlaciones también fueron determinadas entre la acumulación de A $\beta$  en plasma a las 24 horas (el área bajo la curva, AUC) y la carga de A $\beta$  hipocámpico o la carga amiloide.

60 La figura 6 muestra los resultados obtenidos. Brevemente, fue encontrado que los niveles de línea base (antes de la inyección) de A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$  y la relación calculada de A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  antes de la inyección con m266 no estaban correlacionados con el porcentaje de A $\beta$  o la deposición amiloide. Sin embargo, después de la administración de m266, había correlaciones significativas entre A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$ , y la relación de A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  en plasma tanto con A $\beta$  como con la carga amiloide en el hipocampo y la corteza cingular.

El análisis estadístico de los resultados permite la predicción exacta de la carga de A $\beta$  hipocámpico en estos ratones basado en los niveles en plasma de A $\beta_{40}$  a las 24 horas después de la inyección de m266.

65

## REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer preclínica o clínica que comprende:

(a) medir uno o varios de:

(i) el nivel de  $A\beta_{40}$ ;

(ii) el nivel de  $A\beta_{42}$ ; o

(ii) la relación  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ ;

en una muestra de sangre de un sujeto obtenida en un intervalo de tiempo después de administrar a dicho sujeto una cantidad de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo contenido dentro de las posiciones 13-28 de  $A\beta$  o un anticuerpo que secuestra el péptido  $A\beta$  de su forma unida o circulante en la sangre y cambia el aclaramiento de las formas solubles y unidas de  $A\beta$  en el sistema nervioso central en plasma, en el que dicha cantidad es eficaz para cambiar los niveles de péptidos  $A\beta$  circulantes en la sangre de dicho sujeto cuando dicho sujeto está en una etapa preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer;

(b) comparar el nivel de  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , o la relación  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  en dicho sujeto con un valor de control de dichos niveles, en el que los niveles elevados de  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , o la relación de  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  en dicho sujeto comparado con los niveles de control o la relación identifica a dicho sujeto como en una etapa preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho intervalo de tiempo es menos de 1 semana.

3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho intervalo de tiempo es menos o igual a 24 horas.

4. El método de la reivindicación 3, en el que el intervalo de tiempo es menos o igual a 3 horas.

5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha administración era mediante inyección de dichos anticuerpos.

6. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto es un ser humano y el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o sus fragmentos.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo humanizado o sus fragmentos comprende una cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada de SEQ ID NO: 12.

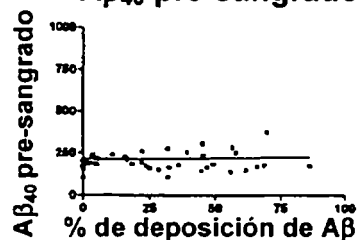
8. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo humanizado o sus fragmentos comprenden una cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada de SEQ ID NO: 16.

9. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo humanizado o sus fragmentos comprenden una cadena ligera que comprende una región variable de SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada que comprende una región variable de SEQ ID NO: 14.

10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un fragmento.

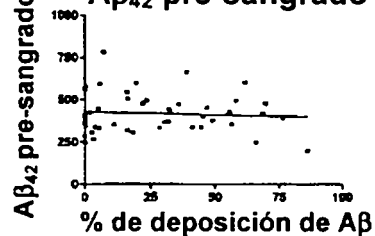
11. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple.

**A** **A $\beta$ <sub>40</sub> pre-sangrado**



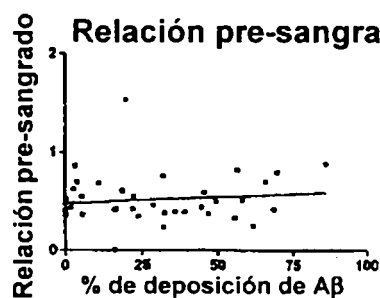
Parámetro	PB40
Número de pares XY	42
r de Pearson	0,02586
Intervalo de confianza del 95%	de -0,2804 a 0,3273
Valor P (dos colas)	0,8709
Resumen del valor P	ns
¿Es significativa la correlación? ( $\alpha=0,05$ )	No
Cuadrado de r	0,0008685

**B** **A $\beta$ <sub>42</sub> pre-sangrado**



Parámetro	PB42
Número de pares XY	47
r de Pearson	-0,07387
Intervalo de confianza del 95%	de -0,3536 a 0,2180
Valor P (dos colas)	0,6217
Resumen del valor P	ns
¿Es significativa la correlación? ( $\alpha=0,05$ )	No
Cuadrado de r	0,005456

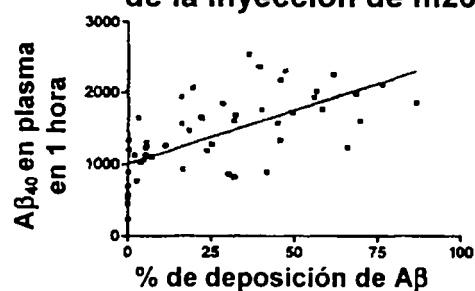
**C** **Relación pre-sangrado**



Parámetro	Relación PB
Número de pares XY	40
r de Pearson	0,1213
Intervalo de confianza del 95%	de -0,1978 a 0,4171
Valor P (dos colas)	0,4560
Resumen del valor P	ns
¿Es significativa la correlación? ( $\alpha=0,05$ )	No
Cuadrado de r	0,01471

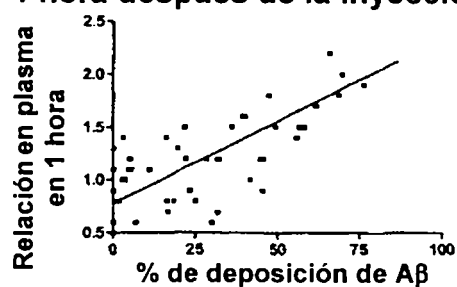
**Figura 1**

**A  $A\beta_{40}$  en plasma 1 hora después de la inyección de m266**



Parámetro	40-1 hora
Número de pares XY	52
r de Pearson	0,6567
Intervalo de confianza del 95%	de 0,4676 a 0,7884
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Resumen del valor P	***
¿Es significativa la correlación? ( $\alpha=0,05$ )	Si
Cuadrado de r	0,4313

**B Relación  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  en plasma 1 hora después de la inyección de m266**



Parámetro	Relación-1 hora
Número de pares XY	52
r de Pearson	0,7565
Intervalo de confianza del 95%	de 0,6093 a 0,8533
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Resumen del valor P	***
¿Es significativa la correlación? ( $\alpha=0,05$ )	Si
Cuadrado de r	0,5723

**Figura 2**

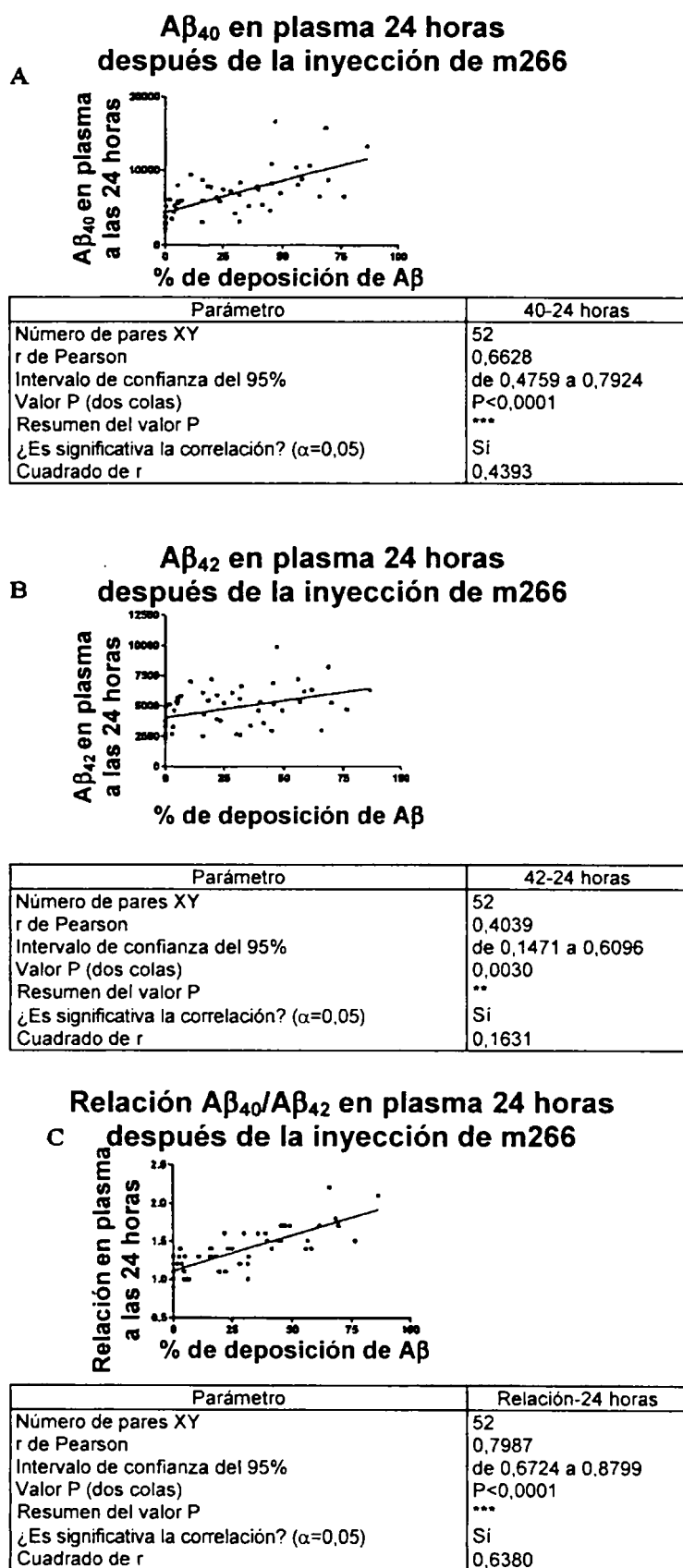
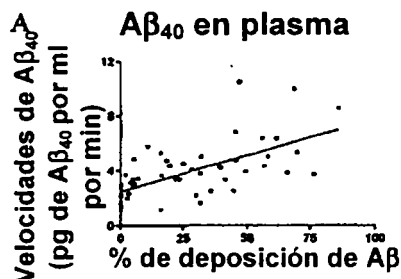


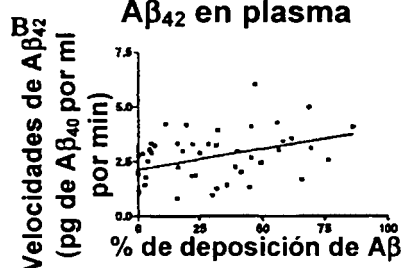
Figura 3

### Velocidad de entrada de $A\beta_{40}$ en plasma



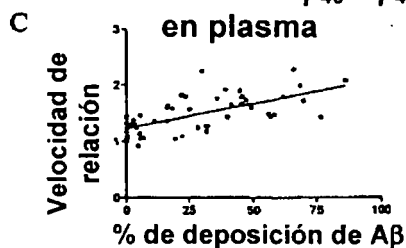
Parámetro	Pendiente de velocidad de 40
Número de pares XY	52
r de Pearson	0,6360
Intervalo de confianza del 95%	de 0,4394 a 0,7745
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Resumen del valor P	***
¿Es significativa la correlación? ( $\alpha=0,05$ )	Si
Cuadrado de r	0,4046

### Velocidad de entrada de $A\beta_{42}$ en plasma



Parámetro	Pendiente de velocidad de 42
Número de pares XY	52
r de Pearson	0,4062
Intervalo de confianza del 95%	de 0,1499 a 0,6114
Valor P (dos colas)	0,0028
Resumen del valor P	**
¿Es significativa la correlación? ( $\alpha=0,05$ )	Si
Cuadrado de r	0,1650

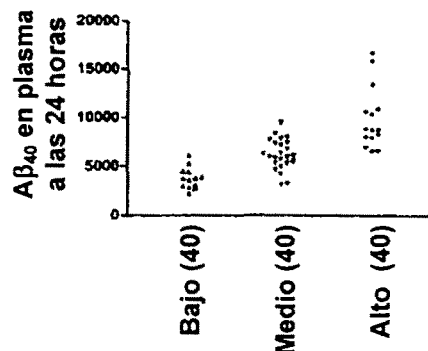
### Relación de la velocidad de entrada de $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ en plasma



Parámetro	Velocidad de la relación
Número de pares XY	52
r de Pearson	0,6551
Intervalo de confianza del 95%	de 0,4653 a 0,7873
Valor P (dos colas)	P<0,0001
Resumen del valor P	***
¿Es significativa la correlación? ( $\alpha=0,05$ )	Si
Cuadrado de r	0,4291

**Figura 4**

**A  $A\beta_{40}$  en plasma 24 horas después de la inyección de m266**

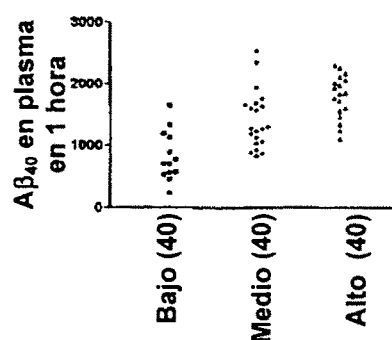


**Revestimiento de  $A\beta$  en el hipocampo**

Análisis unimodal de la varianza	
Valor P	P<0,0001
Resumen del valor P	***
¿Son los promedios significativamente diferentes? (P<0,05)	Si
Número de grupos	3
F	13,88
Cuadrado de r	0,3616

Test Multiple de Comparación de Tukey	Valor P
Bajo (42) vs. Med (42)	P < 0,01
Bajo (42) vs. Alto (42)	P < 0,001
Med (42) vs. Alto (42)	P < 0,05

**B  $A\beta_{40}$  en plasma 1 hora después de la inyección de m266**



**Revestimiento de  $A\beta$  en el hipocampo**

Valor P	P<0,0001
Resumen del valor P	***
¿Son los promedios significativamente diferentes? (P<0,05)	Si
Número de grupos	3
F	20,81
Cuadrado de r	0,4593

Test Multiple de Comparación de Tukey	Valor P
Bajo (40) vs. Med (40)	P < 0,001
Bajo (40) vs. Alto (40)	P < 0,001
Med (40) vs. Alto (40)	P < 0,05

**Figura 5**



Correlación de Aβ en plasma con una patología del tipo Alzheimer en el hipocampo.									
Correlación de Aβ en plasma con carga de Aβ y amiloide fibrilar									
		Pre-sangrado	5 min.	1 Hora	3 Horas	6 Horas	24 Horas	AUC	
<u>Aβ<sub>40</sub> en plasma</u>	Carga de Aβ:	r de Pearson	-0,0158	0,5527	0,5904	0,4310	0,5533	0,5932	0,7056
		Coefficiente de Pearson	0,9209	< 0,0001	< 0,0001	0,0014	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	Carga amiloide:	r de Pearson	0,1535	0,7420	0,6257	0,7053	0,6684	0,7432	0,7624
		Coefficiente de Pearson	0,3378	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<u>Aβ<sub>42</sub> en plasma</u>	Carga de Aβ:	r de Pearson	-0,0614	0,2223	-0,0036	0,1309	0,4551	0,3391	0,5322
		Coefficiente de Pearson	0,6817	0,1207	0,9798	0,3549	0,0008	0,0139	< 0,0001
	Carga amiloide:	r de Pearson	0,0443	0,4790	0,2321	0,3996	0,4476	0,6062	0,6214
		Coefficiente de Pearson	0,7698	0,0005	0,1013	0,0037	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<u>Relación Aβ<sub>40</sub>/Aβ<sub>42</sub></u>	Carga de Aβ:	r de Pearson	0,0369	0,5223	0,6888	0,4215	0,1754	0,7190	0,6138
		Coefficiente de Pearson	0,8236	< 0,0001	< 0,0001	0,0019	0,2183	< 0,0001	< 0,0001
	Carga amiloide:	r de Pearson	0,1293	0,4825	0,5047	0,4364	0,2843	0,6029	0,5510
		Coefficiente de Pearson	0,4393	0,0004	0,0002	0,0014	0,0454	< 0,0001	< 0,0001

Figura 6

## ES 2 295 401 T3

### LISTA DE SECUENCIAS

<110> COMPAÑÍA ELY LILLY Y UNIVERSIDAD DE WASHINGTON

5 <120> MÉTODO DE ENSAYO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

<130> 8792/292

10 <150> 60/334,987  
<151> 2001-10-23

15 <150> 60/313,221  
<151> 2001-08-17

20 <150> 60/313,224  
<151> 2001-08-17

<160> 16

25 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 16  
<212> PRT  
30 <213> *Mus sp.*

<220>

35 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(16)  
<223> CDR1 DE CADENA LIGERA

40 <400> 1

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

45 <210> 2  
<211> 7  
<212> PRT  
50 <213> *Mus sp.*

<220>

55 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<223> CDR2 DE CADENA LIGERA

<400> 2

60 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

65 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT

## ES 2 295 401 T3

<213> *Mus sp.*

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(9)

<223> CDR3 DE CADENA LIGERA

10 <400> 3

Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

15

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

20 <213> *Mus sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(5)

<223> CDR2 DE CADENA PESADA

30 <400> 4

Arg	Tyr	Ser	Met	Ser
1				5

35 <210> 5

<211> 17

<212> PRT

40 <213> *Mus sp.*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

45 <222> (1)..(17)

<223> CDR2 DE CADENA PESADA

<400> 5

50

Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

55

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

60 <213> *Mus sp.*

<220>

65 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(3)

<223> CDR3 DE CADENA PESADA

## ES 2 295 401 T3

<400> 6  
     Gly Asp Tyr  
     1  
 5     <210> 7  
     <211> 113  
 10    <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
 15    <223> Anticuerpo humanizado  
  
     <220>  
     <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
 20    <222> (1)..(113)  
     <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO HUMANIZADO  
  
     <220>  
 25    <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
     <222> (88)..(88)  
     <223> Xaa en la posición 88 es Val o Leu  
 30    <220>  
     <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
     <222> (105)..(105)  
 35    <223> Xaa en la posición 105 es Gln o Gly  
  
     <220>  
 40    <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
     <222> (108)..(108)  
     <223> Xaa en la posición 108 es Lys o Arg  
  
     <220>  
 45    <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
     <222> (109)..(109)  
 50    <223> Xaa en la posición 109 es Val o Leu  
  
     <220>  
     <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
 55    <222> (14)..(14)  
     <223> Xaa en la posición 14 es Thr o Ser  
  
     <220>  
 60    <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
     <222> (15)..(15)  
     <223> Xaa en la posición 15 es Leu o Val  
 65    <220>  
     <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

## ES 2 295 401 T3

<222> (30)..(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Ile o Val

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (50)..(50)

10 <223> Xaa en la posición 50 es Arg, Gln o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

15 <222> (7)..(7)

<223> Xaa en la posición 7 es Ser o Thr

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Val o Ile

25 <400> 7

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

30

**Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa Tyr Ser**  
**20 25 30**

35

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

40

**Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro**  
**50 55 60**

45

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

50

**Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser**  
**85 90 95**

55

**Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys**  
**100 105 110**

**Arg**

60

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

65

<213> Secuencia artificial

## ES 2 295 401 T3

<220>  
<223>

5 <220> Anticuerpo humanizado  
<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (1)..(112)

10 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL ANTICUERPO HUMANIZADO  
  
<220>  
<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
15 <222> (76)..(76)  
<223> Xaa en la posición 76 es Lys o Arg  
  
<220>  
20 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (89)..(89)  
<223> Xaa en la posición 89 es Glu o Asp  
25 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (107)..(107)  
30 <223> Xaa en la posición 107 es Leu o Thr  
  
<220>  
35 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa en la posición 1 es Glu o Gln  
  
<220>  
40 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (7)..(7 )  
<223> Xaa en la posición 7 es Ser o Leu  
45 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
50 <222> (46)..(46)  
<223> Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser  
  
<220>  
55 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (63)..(63 )  
<223> Xaa en la posición 63 es Thr o Ser  
60 <220>  
<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (75)..(75)  
65 <223> Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val o Thr

# ES 2 295 401 T3

<400> 8

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

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(113)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO HUMANIZADO

## ES 2 295 401 T3

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser  
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Ser  
85 90 95

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

Arg

 $\langle 210 \rangle$  10 $\langle 211 \rangle$  112

<212> PRT

### <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> Anticuerpo humanizado

 $\langle 220 \rangle$ 

## <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

$\langle 222 \rangle$  (1)..(112)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL ANTICUERPO HUMANIZADO



# ES 2 295 401 T3

<400> 10

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

<210> 11

35 <211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

45 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(219)

<223> CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO HUMANIZADO

50 <400> 11

55	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly	1	5	10	15
60	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ile	Tyr	Ser	20	25	30	
65	Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	35	40	45	

# ES 2 295 401 T3

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 5  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 10  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 15  
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 20  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 25  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160  
 35  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 40  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190  
 45  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 50  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

50 <210> 12  
 <211> 442  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Anticuerpo humanizado  
 60 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
 <222> (1)..(442)  
 65 <223> CADENA PESADA DEL ANTICUERPO HUMANIZADO

# ES 2 295 401 T3

<400> 12

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

# ES 2 295 401 T3

	100	105	110
5	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys 115 120 125		
10	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 130 135 140		
15	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 145 150 155 160		
20	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 165 170 175		
25	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 180 185 190		
30	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 195 200 205		
35	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 210 215 220		
40	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 225 230 235 240		
45	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 245 250 255		
50	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 260 265 270		
55	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 275 280 285		
60	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		

# ES 2 295 401 T3

	290	295	300
5	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 305 310 315 320		
10	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 325 330 335		
15	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 340 345 350		
20	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 355 360 365		
25	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 370 375 380		
30	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 385 390 395 400		
35	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 405 410 415		
40	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 420 425 430		
45	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440		

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Variante de ratón

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(17)

<223> CDR2 DE CADENA PESADA

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa en la posición 7 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 8 no es ni Asp ni Pro y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 7 no es Asn

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

## ES 2 295 401 T3

- <222> (8)..(8)
- <223> Xaa en la posición 8 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 9 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 8 es Asp o Pro
- 5 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE
- <222> (9)..(9)
- 10 <223> Xaa en la posición 9 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 7 es Asn y Xaa en la posición 8 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 9 no es ni Ser ni Thr
- <400> 13
- 15 Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15  
Gly
- 20 <210> 14  
<211> 112  
<212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Anticuerpo humanizado
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE
- 35 <222> (1)..(112)  
<223> Región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado desglicosilado
- <220>
- 40 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (63)..(63)  
<223> Xaa en la posición 63 es Thr o Ser
- 45 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (1)..(1)
- 50 <223> Xaa en la posición 1 es Glu o Gln
- <220>
- 55 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa en la posición 7 es Ser o Leu
- 60 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE  
<222> (46)..(46)  
<223> Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser
- 65 <220>

## ES 2 295 401 T3

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (57)..(57)

<223> Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es ni Ser ni Thr

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (75)..(75)

<223> Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val o Thr

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (76)..(76)

<223> Xaa en la posición 76 es Lys o Arg

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (89)..(89)

<223> Xaa en la posición 89 es Glu o Asp

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (107)..(107)

<223> Xaa en la posición 107 es Leu o Thr

# ES 2 295 401 T3

<400> 14

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

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

15 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Leu Val  
35 40 45

20 Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val  
50 55 60

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

35 <210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

45 <220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(112)

50 <223> Región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado desglucosilado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

55 <222> (56)..(56)

<223> Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn

60 <220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (57)..(57)

65 <223> Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro

<220>



## ES 2 295 401 T3

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es ni Ser ni Thr

<400> 15

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

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

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

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala 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 Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

<210> 16

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(442)

<223> Cadena pesada del anticuerpo humanizado

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa en la posición 56 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro y Xaa en la posición 59 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 56 no es Asn

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (57)..(57)

## ES 2 295 401 T3

<223> Xaa en la posición 57 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 58 es Ser o Thr, entonces Xaa en la posición 57 es Asp o Pro

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa en la posición 58 es cualquier aminoácido, con tal de que si Xaa en la posición 56 es Asn y Xaa en la posición 57 no es ni Asp ni Pro, entonces Xaa en la posición 58 no es ni Ser ni Thr

<400> 16

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

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

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

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala 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 Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

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

# ES 2 295 401 T3

	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
	130						135					140				
5	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
	145					150					155					160
10	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
					165					170					175	
15	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
				180					185					190		
20	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			195					200					205			
25	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
	210						215					220				
30	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	225					230					235					240
35	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
					245					250					255	
40	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
				260					265					270		
45	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			275					280					285			
50	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
	290						295					300				
55	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	305					310					315					320
60																
65																

# ES 2 295 401 T3

	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
					325					330					335	
5	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
				340					345					350		
10	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			355					360					365			
15	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		370					375					380				
20	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	385					390					395					400
25	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
					405					410					415	
30	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
			420						425					430		
35	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			435					440								
40																
45																
50																
55																
60																
65																