



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

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

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

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 sintomatologías 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.

20 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 predisponentes 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).

35 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.

40 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.

45 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 $A\beta$ polyclonales y monoclonales disminuyen la deposición de $A\beta$ en las placas amiloides en el modelo de ratón transgénico APP^{V717F} 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 $A\beta$.

ES 2 295 401 T3

Los niveles tanto de $\text{A}\beta_{40}$ soluble como de $\text{A}\beta_{42}$ en FCE y sangre pueden ser detectados fácilmente usando ensayos estandarizados usando anticuerpos dirigidos contra epítopos a lo largo de la cadena de $\text{A}\beta$. Tales ensayos han sido mencionados, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°s. 5.766.846, 5.837.672 y 5.593.846. Estas patentes describen la producción de anticuerpos monoclonales murinos al dominio central del péptido $\text{A}\beta$, y se ha publicado que tenían 5 epítopos 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 inmunoreaccionaban con las posiciones 13-28 del péptido $\text{A}\beta$; 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 α -secretasa) la que era el objetivo de estos anticuerpos. Entre los anticuerpos conocidos que se unen entre los 10 aminoácidos 13 y 28 de $\text{A}\beta$ 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 $\text{A}\beta$, y que son 15 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 $\text{A}\beta$ 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 $\text{A}\beta$ de su forma unida y circulante en la sangre y cambian el aclaramiento de las 20 formas soluble y unida de $\text{A}\beta$ en el sistema nervioso central y el plasma. Estos anticuerpos, y sus fragmentos, se unen específicamente a un epítopo entre los aminoácidos 13 y 28 de la molécula $\text{A}\beta$. El CDR de estos anticuerpos puede 25 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 30 propiedades *in vitro* e *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 35 clínica que comprende:

(a) medir uno o varios de:

- 35 (i) el nivel de $\text{A}\beta_{40}$;
- (ii) el nivel de $\text{A}\beta_{42}$; o
- (iii) la relación $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$;

40 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 epítopo contenido dentro de las posiciones 13-28 de $\text{A}\beta$ o un anticuerpo que secuestra el péptido $\text{A}\beta$ de su forma unida y circulante en la sangre y cambia el aclaramiento de las formas solubles y unidas de $\text{A}\beta$ en el sistema nervioso central en el plasma, en el que dicha cantidad es eficaz para cambiar los niveles de los péptidos $\text{A}\beta$ circulantes en la sangre de dicho sujeto cuando dicho sujeto está en una etapa 45 preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer; y

(b) comparar el nivel de $\text{A}\beta_{40}$, $\text{A}\beta_{42}$, o la relación de $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ en dicho sujeto con un valor de control de dichos 50 niveles, en el que los niveles elevados de $\text{A}\beta_{40}$, $\text{A}\beta_{42}$, o la relación de $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ 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 $\text{A}\beta_{40}$ (Figura 1A), $\text{A}\beta_{42}$ (Figura 1B) y la relación 55 $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ (Figura 1C) en plasma de ratones transgénicos antes de la administración del anticuerpo m266, y la carencia de correlación con los depósitos de $\text{A}\beta$ en cerebro.

Las Figuras 2 A y B son gráficos que muestran a $\text{A}\beta_{40}$ en plasma (Figura 2A) y la relación $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ en plasma (Figura 2B) en ratones transgénicos una hora después de la inyección del anticuerpo m266, y la correlación significativa 60 con los depósitos de $\text{A}\beta$ en cerebro.

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

65 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 $\text{A}\beta$ (Figuras 4A y 4B) y su relación (Figura 4C) y la deposición del péptido $\text{A}\beta$ 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 15 lipídicas de las células. No es por eso sorprendente que el péptido $A\beta$ circulante normalmente esté complejado con otros restos que le impiden agregarse. Esto ha causado dificultades en la detección del péptido $A\beta$ circulante en fluidos biológicos.

20 Los documentos de patente anteriormente mencionados (patentes de EE.UU. N°s. 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^{V717F}, 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 25 no sólo para llevar a cabo ensayos para péptidos $A\beta$ circulantes en sí, sino que también para producir los niveles circulantes 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 epítopo contenido entre las posiciones 13-28 de $A\beta$. La región entera no tiene que ser reconocida. Siempre que el anticuerpo se une a un epítopo dentro de esta región (especialmente, por ejemplo, incluyendo el sitio de α -secretasa 16-17 o el sitio al cual el anticuerpo 266 se une), 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 40 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 45 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.

50 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 55 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.

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 60 aminoácidos más.

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 65 la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por las regiones marco, permitiéndose la unión a un epítopo 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”]

ES 2 295 401 T3

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 epítopo que abarca la región 13-28 del péptido A β 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 β *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 químérico 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:

60

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

65 (SEQ ID NO:1)

ES 2 295 401 T3

CDR2 de cadena ligera:

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

CDR3 de cadena ligera:

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

CDR1 de cadena pesada:

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

20 CDR2 de cadena pesada:

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

30 y, CDR3 de cadena pesada:

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

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:

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

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

60

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 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

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 | | | |
| 10 | 260 | 265 | 270 | |
| | 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 | | | |
| 20 | 305 | 310 | 315 | |
| | 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 |
| | | Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu | | |
| 30 | 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 | | | |
| 45 | 425 | 430 | 435 | |
| | Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser | | | |
| | | 440 | | |
| | Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:12) | | | |

50

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 A β es notablemente más alta que la del 266 humanizado. La CDR2 de cadena pesada del 266 desglicosado humanizado tiene las secuencias de aminoácidos siguientes:

65

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;

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.

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:

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;

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
10 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.

Una región variable de cadena pesada particularmente preferida de un anticuerpo desglicosado humanizado tiene
30 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 | | |
| 40 | 20 | 25 | 30 | |
| | Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser | | | |
| 45 | 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 Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr | | | |
| 55 | 65 | 70 | 75 | |
| | Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala | | | |
| 60 | 80 | 85 | 90 | |
| | Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp | | | |
| 65 | 95 | 100 | 105 | |
| | Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly | | | |
| 70 | 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 aminoácidos:

10

40

45

50

60

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
 215 220 225
 20 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
 260 265 270
 30 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
 305 310 315
 40 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
 350 355 360
 50 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
 395 400 405
 60 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

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

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;

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.

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 $A\beta$ 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.

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. Las 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.

La administración sistemática 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 colesterolhemisuccinato, fosfatidilgliceroles y otros similares.

ES 2 295 401 T3

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-

- 5 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 10 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 15 pH entre 4 y 8 es tolerado.

- 15 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.

- 20 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.

- 25 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.

- 30 35 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.

- 40 45 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.

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

- 55 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 epítopo 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.

- 60 Ejemplo 1

Correlación de los niveles de péptido circulantes con placas

- 65 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

ES 2 295 401 T3

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 μg 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 10 $A\beta$ 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 $A\beta$.

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 15 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 40 distinguidos de aquellos con una alta deposición como una función del nivel en plasma de $A\beta_{40}$.

Ejemplo 2

40 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 μg 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 45 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 55 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.

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.

65 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.

REIVINDICACIONES

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

5 (a) medir uno o varios de:

- (i) el nivel de $\text{A}\beta_{40}$;
- 10 (ii) el nivel de $\text{A}\beta_{42}$; o
- (ii) la relación $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$;

15 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 epítopo contenido dentro de las posiciones 13-28 de $\text{A}\beta$ o un anticuerpo que secuestra el péptido $\text{A}\beta$ de su forma unida o circulante en la sangre y cambia el aclaramiento de las formas solubles y unidas de $\text{A}\beta$ en el sistema nervioso central en plasma, en el que dicha cantidad es eficaz para cambiar los niveles de péptidos $\text{A}\beta$ circulantes en la sangre de dicho sujeto cuando dicho sujeto está en una etapa preclínica o clínica de la enfermedad de Alzheimer;

20 (b) comparar el nivel de $\text{A}\beta_{40}$, $\text{A}\beta_{42}$, o la relación $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ en dicho sujeto con un valor de control de dichos niveles, en el que los niveles elevados de $\text{A}\beta_{40}$, $\text{A}\beta_{42}$, o la relación de $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

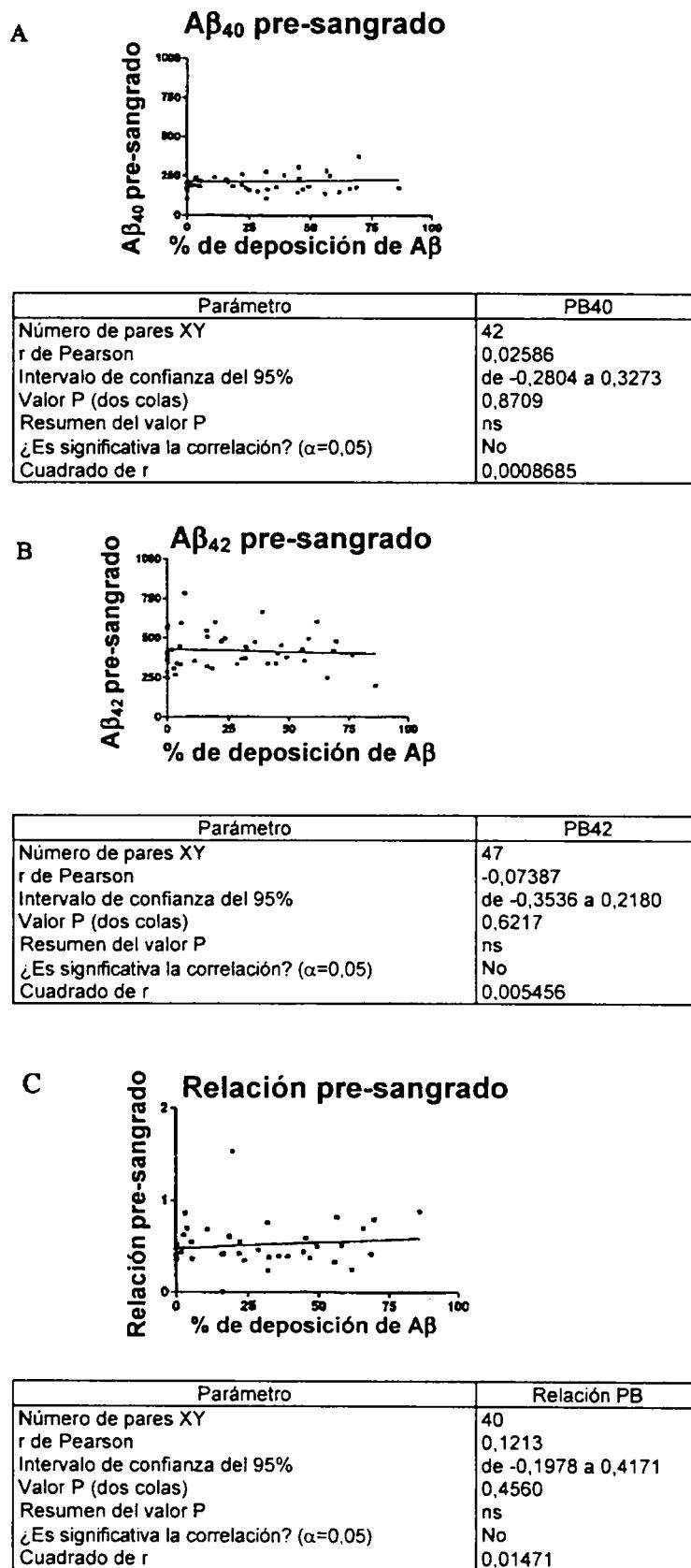
11. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple.

50

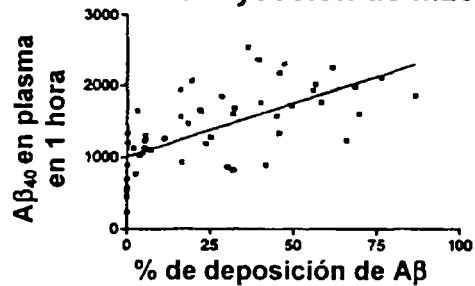
55

60

65

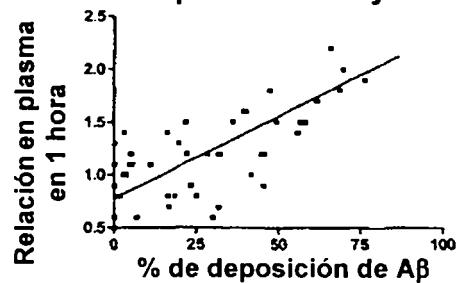
**Figura 1**

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? ($\alpha=0,05$) | Sí |
| 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? ($\alpha=0,05$) | Sí |
| Cuadrado de r | 0,5723 |

Figura 2

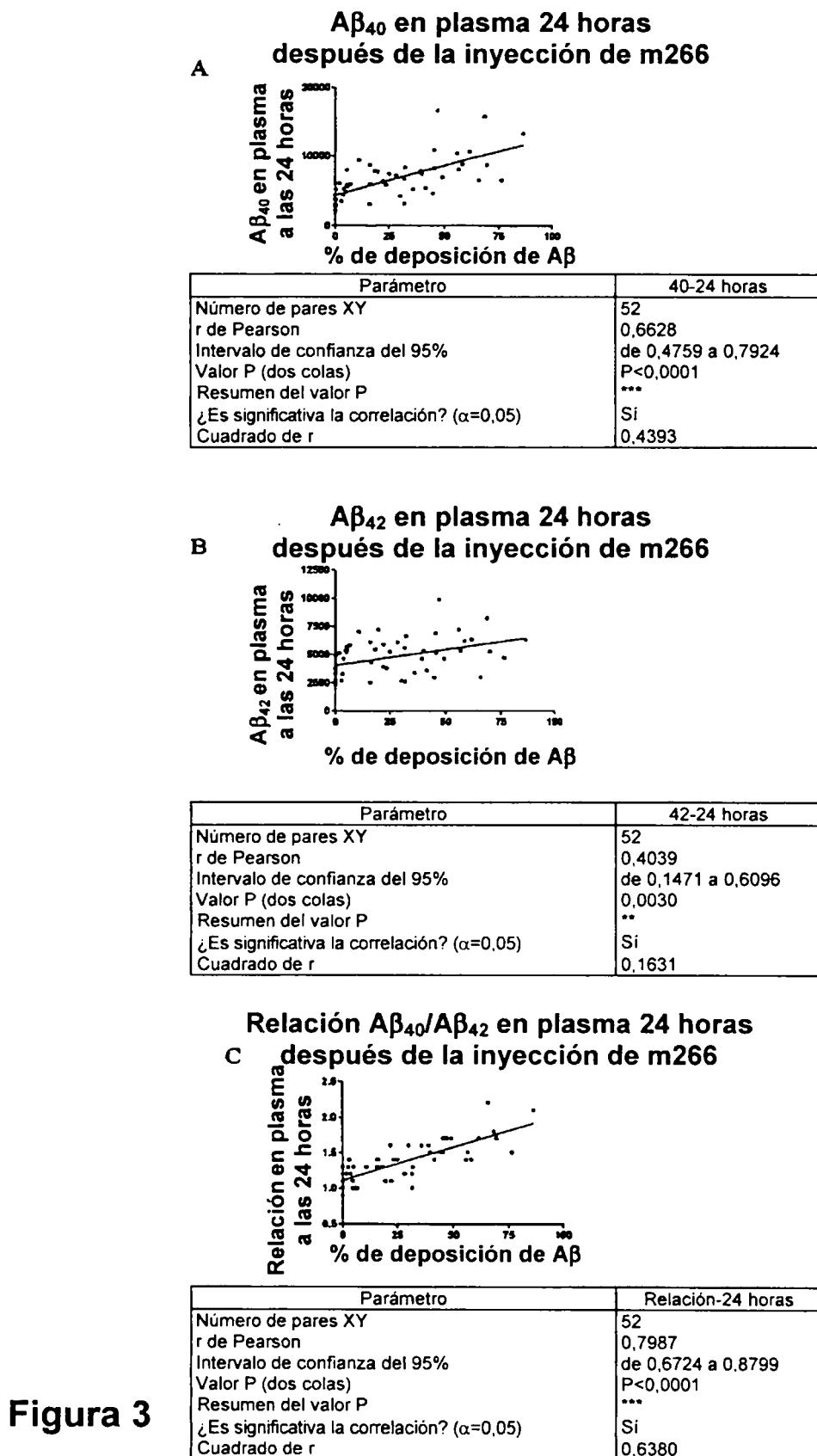
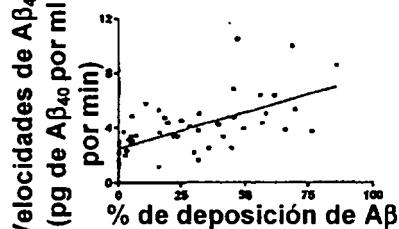


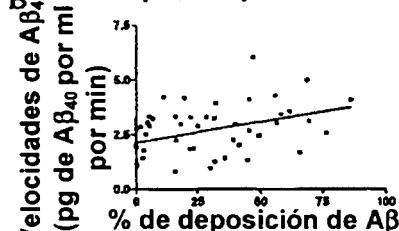
Figura 3

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



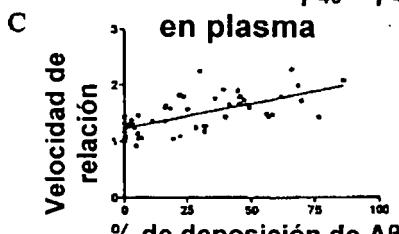
| Parámetro | Pendiente de velocidad de 40 |
|---|------------------------------|
| Número de pares XY | 52 |
| r de Pearson | 0,6360 |
| Intervalo de confianza del 95% | de 0,4394 a 0,7745 |
| Valor P (dos colas) | P<0,0001 |
| Resumen del valor P | *** |
| ¿Es significativa la correlación? ($\alpha=0,05$)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

Velocidad de entrada de $\text{A}\beta_{42}$ 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? ($\alpha=0,05$) | Sí |
| Cuadrado de r | 0,1650 |

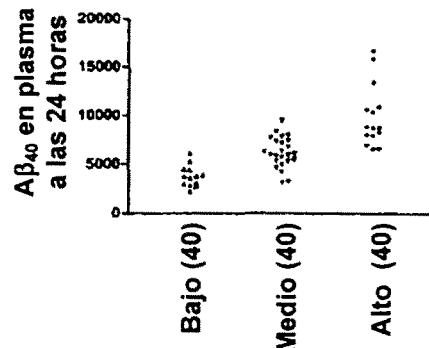
Relación de la velocidad de entrada de $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ en plasma



| 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? ($\alpha=0,05$) | Sí |
| Cuadrado de r | 0,4291 |

Figura 4

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

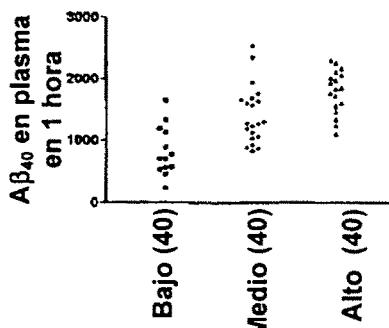


Revestimiento de $\text{A}\beta$ en el hipocampo

| | |
|--|----------|
| Analisis unimodal de la varianza | P<0,0001 |
| Valor P | *** |
| 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 $\text{A}\beta_{40}$ en plasma 1 hora después
de la inyección de m266**



Revestimiento de $\text{A}\beta$ 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 A β en plasma con una patología del tipo Alzheimer en el hipocampo. | | | | | | | |
|--|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Correlación de A β en plasma con carga de A β y amiloide fibrilar Pre-sangrado 5 min. | | | | | | |
| | | 1 Hora | 3 Horas | 6 Horas | 24 Horas | AUC | |
| <u>Aβ_{10} en plasma</u> | Carga de Aβ: r de Pearson | -0,0158 | 0,5527 | 0,4310 | 0,5533 | 0,5932 | 0,7056 |
| | Coeficiente de Pearson | 0,9209 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| <u>Aβ_{42} en plasma</u> | Carga amiloide: r de Pearson | 0,1535 | 0,7420 | 0,6257 | 0,7053 | 0,6684 | 0,7432 |
| | Coeficiente de Pearson | 0,3378 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| <u>Relación A$\beta_{10}/A\beta_{42}$</u> | Carga de Aβ: r de Pearson | -0,0614 | 0,2223 | -0,0036 | 0,1309 | 0,4551 | 0,3391 |
| | Coeficiente de Pearson | 0,6817 | 0,1207 | 0,9798 | 0,3549 | 0,0008 | 0,0139 |
| <u>Relación A$\beta_{10}/A\beta_{42}$</u> | Carga amiloide: r de Pearson | 0,0443 | 0,4790 | 0,2321 | 0,3996 | 0,4476 | 0,6062 |
| | Coeficiente de Pearson | 0,7698 | 0,0005 | 0,1013 | 0,0037 | < 0,0001 | < 0,0001 |

Figura 6

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

<150> 60/313,224

20 <151> 2001-08-17

<160> 16

25 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

30 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<220>

35 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(16)

<223> CDR1 DE CADENA LIGERA

40 <400> 1

45 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

50 <212> PRT

<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

<400> 6

5 Gly Asp Tyr
1

<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

35 <222> (105)..(105)

<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

45 <220>

<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

- <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
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE
<222> (7)..(7)
- 45 <223> Xaa en la posición 7 es Ser o Leu
- <220>
50 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE
<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 | |
| | Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser | 100 | 105 | 110 | |

35 <210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificia
40 <220>

<223> Anticuerpo humanizado
45 <220>
 <221> CARACTÉRISTICA VARIABLE
 <222> (1)..(113)
50 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO HUMANIZADO

55

60

65

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

Arg

<210> 10

<211> 112

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Anticuerpo humanizado

<220>

50

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (1)..(112)

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL ANTICUERPO HUMANIZADO

55

60

65

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | | | |

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

55 <210> 12
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Anticuerpo humanizado

65 <220>
<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE
<222> (1)..(442)
<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

40

45

50

55

60

65

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 |
| 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 |
| 45 | 240 | | |
| | 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 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Variante de ratón

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE
 <222> (1)..(17)

55 <223> CDR2 DE CADENA PESADA

60 <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

65 <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

25 <212> PRT

<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)

65 <223> Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp o Ser

<220>

ES 2 295 401 T3

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (56)..(56)

5 <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

10 <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

15 <220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (58)..(58)

20 <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>

25 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (75)..(75)

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

30 <220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (76)..(76)

35 <223> Xaa en la posición 76 es Lys o Arg

<220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

40 <222> (89)..(89)

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

<220>

45 <221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (107)..(107)

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

50

55

60

65

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

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA VARIABLE

<222> (58)..(58)

10 <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

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

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

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

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

35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

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

55

60

65

ES 2 295 401 T3

5 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

10 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

15 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

20 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190

25 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

30 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220

35 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

40 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

45 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270

50 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

55 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

60 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

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