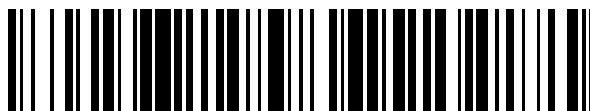


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 184 660**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2001 E 01913081 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **06.03.2013 EP 1257584**

54

Título: **Anticuerpos humanizados que secuestran el péptido amiloide beta**

30

Prioridad:

24.02.2000 US 184601 P

08.12.2000 US 254465 P

08.12.2000 US 254498 P

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
09.05.2013

73

Titular/es:

**WASHINGTON UNIVERSITY ST. LOUIS (50.0%)
1 BROOKINGS DRIVE
ST. LOUIS MISSOURI 63110, US y
ELI LILLY AND COMPANY (50.0%)**

72

Inventor/es:

**HOLTZMAN, DAVID M.;
DEMATOS, RONALD;
BALES, KELLY R.;
PAUL, STEVEN M.;
TSURUSHITA, NAOYA y
VASQUEZ, MAXIMILIANO**

74

Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados que secuestran el péptido amiloide beta.

Campo técnico

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados que se unen a un epítipo entre los aminoácidos 13 y 28 del péptido A β y para el tratamiento preventivo y terapéutico de las enfermedades relacionadas con el amiloide beta, tales como la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral. Se refiere más específicamente, al uso de anticuerpos monoclonales humanizados para secuestrar el péptido amiloide beta (A β) en el plasma, cerebro y fluido cerebroespinal para impedir la acumulación o para invertir la deposición del péptido A β en el cerebro y en los vasos sanguíneos del cerebro y para mejorar el conocimiento.

Técnica anterior

Numerosas patologías que producen insuficiencias cognitivas, apoplejía, hemorragia cerebral y debilitamiento mental general parece que están relacionadas con las placas neuríticas y cerebrovasculares en el cerebro que contiene el péptido amiloide beta (A β). Entre estas enfermedades están tanto el cuadro preclínico como el clínico de Alzheimer, el síndrome de Down, y la angiopatía preclínica y clínica amiloide cerebral (CAA). Las placas amiloides están formadas por péptidos amiloides beta. Estos péptidos circulan en la sangre y en el fluido cerebroespinal (CSF), normalmente en forma acoplada con lipoproteínas. El péptido A β en forma circulante se compone de 39 a 43 aminoácidos (normalmente 40 ó 42 aminoácidos) procedentes de la escisión de una proteína precursora común, una proteína precursora amiloide, con frecuencia denominada APP. Algunas formas de A β soluble son ellas mismas neurotóxicas y pueden determinar la gravedad de la neurodegeneración y/o la disminución del conocimiento (McLean, C.A., *et al.*, *Ann. Neurol.* (1999) 46:860-866; Lambert, M.P., *et al.*, (1998) 95:6448-6453; Naslund, J., *J. Am. Med. Assoc.* (2000) 283:1571).

La prueba sugiere que A β se puede volver a transportar y así sucesivamente 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 A β en las placas está en equilibrio con A β soluble en el cerebro y en la sangre (Kawarabayashi T., *et al.*, *J. Neurosci.* (2001) 21:372-381).

Tal como se describe en la solicitud de PCT US00/35681 y en el documento U.S. n° de serie 09/153.130 incorporados ambos en esta memoria por referencia, las concentraciones circulantes totales del péptido A β en el CSF son similares en individuos normales y en individuos predispuestos a presentar los síntomas de Alzheimer. Sin embargo, las concentraciones de A β ₄₂ son menores por término medio en individuos con enfermedad de Alzheimer (Nitsch, R.M., *et al.*, *Ann. Neurol.* (1995) 37:512-518). Es conocido que A β ₄₂ es más propenso a acumularse que A β ₄₀ y cuando esto sucede, surgen consecuencias desfavorables tales como la deposición de A β en las placas amiloides, la transformación de A β en formas tóxicas solubles, la alteración de las células nerviosas y el trastorno del comportamiento tal como la demencia (Golde, T.E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* (2000) 1502:172-187).

Los procedimientos para provocar una respuesta inmunitaria para reducir los depósitos amiloides se describen en la publicación PCT WO99/27944 publicada el 10 de junio de 1999. La descripción supone que el péptido A β acumulado completo resultaría un inmunógeno útil. La administración de un fragmento A β (aminoácidos 13 a 28) conjugado con IgG anti-ratón de oveja no produjo cambio en la carga amiloide de la corteza cerebral y únicamente uno entre nueve animales que recibieron inyecciones del conjugado del fragmento 13 a 28 de A β presentó alguna linfoproliferación en respuesta a A β ₄₀. La solicitud también indica que se podrían utilizar los anticuerpos que se unen de forma específica al péptido A β como agentes terapéuticos. Sin embargo, parece que esto es una especulación ya que los datos que lo apoyan reflejan los protocolos que implican el uso de la inmunización activa, por ejemplo, A β ₄₂. Los péptidos se suministran utilizando adyuvantes y se determinan los títulos de anticuerpo formados en la inmunización, así como las concentraciones de péptido A β y del péptido precursor. La publicación sugiere claramente que la placa A β debe reducirse para aliviar los síntomas de Alzheimer y que se necesitan los procesos mediados por las células para la reducción con éxito de la placa A β .

El documento WO 99/60024, publicado el 25 de noviembre de 1999, se refiere a los procedimientos para la eliminación de amiloides utilizando anticuerpos antiamiloides. El mecanismo, sin embargo, está indicado para utilizar la capacidad de los anticuerpos anti-A β para unirse a los depósitos amiloides preformados (es decir, placas) y produce la eliminación microglial local posterior de placas localizadas. Este mecanismo no se ensayó *in vivo*. Esta publicación indica además que para ser eficaz entre las placas A β , los anticuerpos anti-A β deben conseguir entrar en el parénquima cerebral y a través de la barrera sangre-cerebro.

El 7 de diciembre de 2000 se publicaron varias solicitudes PCT que se refieren a intentos para controlar las placas amiloides. El documento WO 00/72880 describe la reducción significativa en las placas en la corteza cerebral y el hipocampo en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer cuando se trata utilizando fragmentos N-terminales de péptido A β y anticuerpos que se unen a ellos, pero no cuando se trata con el fragmento 13 a 28 de A β conjugado con IgG anti-ratón de oveja o con un anticuerpo contra el fragmento 13 a 28, del anticuerpo 266. Los anticuerpos dirigidos N-terminales se impusieron para cruzar la barrera sangre-cerebro y para provocar fagocitosis de las placas amiloides en estudios *in vitro*.

El documento WO 00/72876 tiene prácticamente la misma descripción que el documento WO 00/72880 y se refiere a la inmunización con los propios componentes de la fibrilla amiloide.

El documento WO 00/77178 describe anticuerpos que se diseñaron para catalizar la hidrólisis del β -amiloide, incluyendo los anticuerpos obtenidos contra una mezcla de los compuestos de transición de fenilalanina estatina Cys-A β ₁₀₋₂₅, estatina Phe₁₉-Phe₂₀ y Cys-A β ₁₀₋₂₅ estatina Phe₂₀-Ala₂₁ y anticuerpos obtenidos contra A β ₁₀₋₂₅ que tienen un enlace amida reducido entre Phe₁₉ y Phe₂₀. Este documento menciona el secuestro de A β , pero esto es una suposición porque no da pruebas de dicho secuestro. Además, el documento no proporciona pruebas *in vivo* de que la administración de anticuerpos produzca la salida de A β del sistema nervioso central, interfiera con la formación de placas, reduzca la carga de placa, forme complejos entre los anticuerpos y A β en las muestras de tejido o afecte al conocimiento.

Se ha demostrado que una vía para el metabolismo de A β es la vía de transporte desde el SNC al plasma (Zloko- vic, B.V., *et al.*, *Proc. Natt. 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 β en el plasma puede atravesar la barrera sangre-cerebro y entrar en el cerebro (Zlokovic, B. V., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1993) 67:1034-1040). Se ha demostrado también que la administración de determinados anticuerpos A β policlonales y monoclonales disminuye la deposición de A β 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); sin embargo, se dijo que esto es debido a determinados anticuerpos anti-A β que atraviesan la barrera sangre-cerebro estimulando la fagocitosis de las placas amiloides por las células microgliales. En los experimentos de Bard, los análisis de secciones de cerebro *ex vivo* demostraron que la presencia de anticuerpo A β añadido, junto con la microglia añadida exógenamente, produjo fagocitosis de A β , dando como resultado la eliminación de los depósitos de A β .

Los niveles tanto de A β ₄₀ soluble como de A β ₄₂ en el CSF y en la sangre se pueden detectar fácilmente utilizando análisis normalizados que utilizan anticuerpos dirigidos contra epítomos a lo largo de la cadena A β . Dichos análisis han sido descritos, por ejemplo, en las patentes U.S. n° 5.766.846; n° 5.837.672 y n° 5.593.846. Estas patentes describen la producción de anticuerpos monoclonales murinos en el dominio central del péptido A β y se describió que éstas tienen epítomos alrededor e incluyendo las posiciones 16 y 17. Se describieron también los anticuerpos dirigidos contra la zona N-terminal. Se impusieron varios anticuerpos monoclonales para inmunorreaccionar con las posiciones 13 a 28 del péptido A β ; éstos no se unieron a las posiciones 17 a 28 representantes del péptido, por lo tanto, según las citadas patentes, demostrando que es esta zona, incluyendo las posiciones 16 a 17 (el punto α -secretasa) la que era la diana de estos anticuerpos. Entre los anticuerpos conocidos que se unen entre los aminoácidos 13 y 28 de A β están los anticuerpos 266, 4G8 y 1C2 de ratón.

Se ha descubierto ahora de forma inesperada que la administración del anticuerpo 266 restablece el conocimiento (memoria del objeto) muy rápidamente y casi completamente en ratones transgénicos hemicigóticos (APP^{V717F}) de 24 meses. Todavía, el anticuerpo no presenta las propiedades que la técnica da a conocer que se necesitan para que un anticuerpo sea eficaz en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, del síndrome de Down y de otras enfermedades relacionadas con el péptido A β . Para nuestra mayor sorpresa, se observó que los anticuerpos que se unen a A β entre las posiciones 13 y 28 (266 y 4G8) son capaces de secuestrar formas solubles de A β en su unión, formas circulantes en la sangre y que la administración periférica del anticuerpo 266 produce la salida rápida de cantidades relativamente grandes de péptido A β desde el SNC al plasma. Esto produce la eliminación alterada de A β soluble, la prevención de la formación de la placa, y más sorprendentemente, la mejora del conocimiento, sin reducir necesariamente siquiera la carga de la placa amiloide A β , que atraviesa la barrera sangre-cerebro en cualquier medida significativa, decorando la placa, activando los mecanismos celulares o uniéndose con gran afinidad al A β acumulado.

Divulgación de la invención

La invención proporciona un anticuerpo humanizado, o fragmento del mismo, que comprende:

- a. una cadena ligera que comprende tres zonas determinantes de complementariedad (CDR) de cadena ligera que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

cadena ligera CDR1:

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

(SEC. ID N.º: 1)

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

(SEC. ID N.º: 15)

cadena ligera CDR2:

1 5
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (SEC. ID N.º: 2)

y cadena ligera CDR3:

1 5
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr (SEC. ID N.º: 3)

5 y una secuencia con estructura de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina humana; y

b. una cadena pesada que comprende tres CDR de cadena pesada que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

cadena pesada CDR1:

1 5
Arg Tyr Ser Met Ser (SEC. ID n.º: 4)

10 cadena pesada CDR2:

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
(SEC. ID N.º: 5)

o

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
(SEC. ID N.º: 16)

15 y cadena pesada CDR3:

1
Gly Asp Tyr (SEC. ID N.º: 6).

y una secuencia con estructura de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina humana; en la que el anticuerpo o fragmento une específicamente un epítipo que contiene las posiciones 13 a 28 de Aβ.

- 20 La invención proporciona anticuerpos humanizados, o fragmentos de los mismos que afectan positivamente el conocimiento en enfermedades y trastornos en los que puede estar implicado Aβ, tal como en el cuadro clínico o preclínico de Alzheimer, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral clínica o preclínica. Los anticuerpos o los fragmentos de los mismos no necesitan atravesar la barrera sangre-cerebro, decorar la placa amiloide, activar las respuestas celulares o incluso reducir necesariamente la placa de la carga amiloide. En otro aspecto, esta invención
- 25 proporciona anticuerpos y fragmentos humanizados de los mismos, en los que las zonas variables tienen secuencias que comprenden el CDR del anticuerpo 266 de ratón y secuencias de la estructura humana específica (secuencias SEC. ID N.º: 7 - SEC. ID N.º: 10), en las que el anticuerpo o fragmento une específicamente un epítipo que contiene las posiciones 13 y 28 de Aβ. En otro aspecto, esta invención proporciona anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos, en los que la cadena ligera es la SEC. ID N.º: 11 y la cadena pesada es la SEC. ID N.º: 12.
- 30 También forman parte de la invención las secuencias de polinucleótido que codifican los anticuerpos o fragmentos humanizados de los mismos expuestos anteriormente, los vectores que comprenden las secuencias de polinucleótido que codifican los anticuerpos humanizados o los fragmentos de los mismos, las células huésped transformadas con vectores o que incorporan los polinucleótidos que expresan los anticuerpos o fragmentos humanizados de los mismos, las formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos y fragmentos humanizados de los mismos descritas en esta
- 35 memoria y los procedimientos de fabricación y utilización de los mismos.

Dichas formulaciones farmacéuticas resultan útiles para secuestrar Aβ en el hombre; para tratar y prevenir enfermedades y trastornos caracterizados por placas Aβ o toxicidad de Aβ en el cerebro, tales como la enfermedad de

Alzheimer, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral en el hombre; para el diagnóstico de estas enfermedades en el hombre; y para determinar si un paciente humano responderá al tratamiento que utiliza anticuerpos humanos contra A β .

El uso de un anticuerpo humanizado apropiado para la fabricación de un medicamento para secuestrar el péptido A β que circula en los fluidos biológicos es útil para el tratamiento preventivo y terapéutico de las enfermedades relacionadas con la formación de placas difusas, neuríticas y cerebrovasculares que contienen A β en el cerebro. El anticuerpo humanizado, incluyendo un fragmento inmunológicamente reactivo del mismo, produce la eliminación del péptido A β de los complejos macrocelulares que serían normalmente apropiados para transportarlo en los fluidos del cuerpo a y desde los puntos en los que las placas se pueden formar o en los que pueden ser tóxicos. Además, el secuestro del péptido A β del plasma con el anticuerpo o fragmento del mismo se comporta como un "sumidero", que secuestra de forma eficaz el péptido A β soluble en el compartimento del plasma, y que induce a A β a introducirse en el plasma desde las posiciones en el sistema nervioso central (SNC). Al secuestrar A β en la sangre, aumenta la salida neta del cerebro y se evita que se deposite A β soluble en placas insolubles y que se formen especies tóxicas solubles en el cerebro. Además, se puede eliminar del cerebro el A β insoluble en las placas que está en equilibrio con el A β soluble por un efecto secuestrante en la sangre. El secuestro del péptido A β con el anticuerpo aumenta también su eliminación en el cuerpo e inhibe los efectos tóxicos del A β soluble en el cerebro y el desarrollo y acumulación posterior de A β insoluble como amiloide en placas. Los anticuerpos útiles en la invención no atraviesan la barrera sangre-cerebro en grandes cantidades ($\leq 0,1\%$ de concentraciones en el plasma). Además, los anticuerpos humanizados utilizados en la invención, cuando se administran en la periferia, no necesitan producir una respuesta inmunitaria celular en el cerebro cuando se unen a un péptido A β o cuando circulan libremente para obtener sus efectos beneficiosos. Además, cuando se administran en la periferia no necesitan unirse de forma apreciable al péptido A β agregado en el cerebro para tener sus efectos beneficiosos.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere al uso de una cantidad eficaz terapéutica o profilácticamente de anticuerpo monoclonal humanizado o de un fragmento inmunológicamente reactivo del mismo, anticuerpo que se une específicamente a la zona media del péptido A β para la fabricación de un medicamento para tratar y prevenir las enfermedades caracterizadas por la formación de placas que contienen proteína amiloide beta en el hombre. En otro aspecto, la invención se refiere a el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo humanizado que secuestra el péptido A β en su forma circulante en la sangre y provoca la salida del cerebro así como la eliminación de A β alterado en el plasma y en el cerebro para la fabricación de un medicamento para inhibir la formación de placas amiloides y para eliminar las placas amiloides en el hombre. En aspectos adicionales, la invención se refiere a dichos anticuerpos humanizados, incluyendo las partes inmunológicamente eficaces de los mismos y a los procedimientos para su fabricación.

Asimismo la invención incluye el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo humanizado de la invención para la fabricación de un medicamento para invertir el deterioro cognitivo, mejorar el conocimiento, tratar el deterioro cognitivo y prevenir el deterioro cognitivo en un paciente diagnosticado de cuadro clínico o preclínico de Alzheimer, síndrome de Down o angiopatía amiloide cerebral clínica o preclínica.

La invención incluye asimismo el uso de un anticuerpo humanizado de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o contrarrestar la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down o la angiopatía amiloide cerebral; para tratar, prevenir o contrarrestar el deterioro cognitivo en el cuadro clínico o preclínico de Alzheimer, síndrome de Down o angiopatía amiloide cerebral clínica o preclínica; o para inhibir la formación de placas amiloides o los efectos de la especie A β tóxica soluble en seres humanos.

La invención se refiere a la observación sorprendente de que en un corto periodo de tiempo después de la administración de un anticuerpo de la presente invención, salen cantidades relativamente grandes de A β del sistema nervioso central a la sangre. De este modo, esta invención describe procedimientos para evaluar la respuesta de un paciente humano al tratamiento con un anticuerpo que se une a A β o a un fragmento del mismo, que comprende: a) administrar el anticuerpo o un fragmento del mismo al paciente; y b) medir la concentración de A β en la sangre del paciente.

La invención también da a conocer un procedimiento de tratamiento de un paciente humano con un anticuerpo que se une a A β o a un fragmento del mismo, que comprende: a) administrar una primera cantidad del anticuerpo o un fragmento del mismo al paciente; b) entre 3 horas y dos semanas después de la administración de la primera dosis, medir la concentración de A β en la sangre del paciente; c) si es necesario, calcular una segunda cantidad de anticuerpo o fragmento del mismo basándose en el resultado de la etapa b), cuya segunda cantidad es la misma o diferente a la de la primera cantidad; y d) administrar la segunda cantidad de anticuerpo o fragmento.

La invención también da a conocer un procedimiento de evaluación en un paciente humano de la eficacia de un anticuerpo que se une a A β , o a un fragmento del mismo, para inhibir o prevenir la formación de la placa amiloide en A β , para reducir la placa amiloide en A β , para reducir los efectos de la especie A β tóxica soluble o para tratar un trastorno o una enfermedad relacionada con la placa en A β , que comprende: a) obtener una primera muestra del plasma del paciente o de CSF; b) medir una concentración de control de A β en la primera muestra; c) administrar el anticuerpo o un fragmento del mismo al paciente; d) entre 3 horas y dos semanas después de la administración del anticuerpo o del fragmento del mismo, obtener una segunda muestra del plasma del paciente o de CSF; y e) medir la

concentración de A β en la segunda muestra; en la que, la eficacia está relacionada con la cantidad de A β unido al anticuerpo en la sangre y con la concentración de A β en el CSF.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 presenta el porcentaje del péptido A β extraído del fluido cerebroespinal humano a través de una membrana de diálisis por Mab 266 en función del umbral de peso molecular de la membrana de diálisis.

La Figura 2 presenta la concentración de A β_{Total} hallada en el plasma de un ratón transgénico APP^{V717F} después de la inyección de 200 β g ó 600 β g de Mab 266 en función del tiempo.

10 La Figura 3A presenta la cantidad de deposición del péptido A β en la corteza cerebral en el ratón transgénico APP^{V717F} tratado con solución salina, IgG de ratón o Mab 266. La Figura 3B presenta la correlación de estos resultados con origen paterno.

La Figura 4 presenta las secuencias de polinucleótido para expresar la cadena ligera de 266 humanizado en el plásmido pVk-Hu266 y los códigos del único aminoácido para la cadena ligera expresada de 266 humanizado (correspondiente a la SEC. ID n°: 11 cuando está madura).

15 La Figura 5 presenta las secuencias de polinucleótido para expresar la cadena pesada de 266 humanizado en el plásmido pVg1-Hu266 y los códigos del único aminoácido para la cadena pesada expresada de 266 humanizado (correspondiente a la SEC. ID n°: 12 cuando está madura).

La Figura 6 es una cartografía del plásmido de pVk-Hu266.

La Figura 7 es una cartografía del plásmido de pVg1-Hu266.

Modos de poner en práctica la invención

20 Los péptidos A β que circulan en los fluidos biológicos humanos representan la zona carboxi terminal de una proteína precursora codificada en el cromosoma 21. Se ha publicado a partir de los resultados de los experimentos *in vitro* que el péptido A β tiene poca solubilidad en soluciones fisiológicas, ya que contiene un tramo de aminoácidos hidrófobos que son una parte de la zona que ancla su precursor mayor a las membranas de lípido de las células. De este modo no es sorprendente que el péptido A β circulante esté acomplejado normalmente con otros grupos que le impiden acumularse. Esto ha producido dificultades para detectar el péptido A β circulante en los fluidos biológicos.

25 Los documentos de las patentes mencionadas anteriormente (patentes U.S. n° 5.766.846; n° 5.837.672 y n° 5.593.846) dan a conocer la fabricación de anticuerpos, incluyendo un anticuerpo monoclonal, denominado clon 266 que aumentó frente, y se ha demostrado que se une específicamente a un péptido que comprende los aminoácidos 13 a 28 del péptido A β . Los presentes solicitantes han descubierto que los anticuerpos que se unen en esta zona, en contraste con los anticuerpos que se unen en cualquier parte de la secuencia de aminoácido de A β , son capaces de secuestrar el péptido A β soluble de forma muy eficaz en complejos macromoleculares. Este secuestro efectuará la salida del péptido A β puro del SNC, alterará su eliminación en el SNC y en el plasma y reducirá su disponibilidad para la formación de la placa. De este modo, el uso de anticuerpos de esta especificidad, modificados para reducir su inmunogenicidad transformándoles en una forma humanizada para la fabricación del medicamento ofrecen la oportunidad de tratar, tanto profiláctica como terapéuticamente, enfermedades que están relacionadas con la formación de placas beta-amiloides. Estas enfermedades incluyen, como se indicó anteriormente, el cuadro preclínico y clínico de Alzheimer, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral preclínica y clínica.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, la palabra "tratar" comprende el tratamiento terapéutico, en el que se conoce la enfermedad que se ha de tratar ya que está presente y la profilaxis, es decir, la prevención de, o la mejora del posible futuro comienzo de una enfermedad.

35 "Anticuerpos monoclonales que se unen a la zona media del péptido A β " significa los anticuerpos monoclonales (Mab o Mabs) que se unen a una secuencia de aminoácidos que representa un epítrope contenido entre las posiciones 13 a 28 de A β . La zona completa no necesita ser dirigida. Con tal que el anticuerpo se una al menos a un epítrope en esta zona (especialmente, p. ej., incluyendo el punto 16 a 17 de a-secretasa o el punto en el que se une el anticuerpo 266), dichos anticuerpos son eficaces en el procedimiento de la invención.

40 "Anticuerpo" significa un anticuerpo monoclonal *per se*, o un fragmento inmunológicamente eficaz del mismo, tal como un fragmento F_{ab}, F_{ab'}, ó F_{(ab')₂} del mismo. En algunos contextos, en esta memoria, los fragmentos se mencionarán específicamente por énfasis; no obstante, se entiende que independientemente de si los fragmentos son específicos, el término "anticuerpo" incluye dichos fragmentos así como formas de una sola cadena. Con tal que la proteína conserve la capacidad para unirse específicamente a su diana deseada, y en este caso, para secuestrar el péptido A β en sus proteínas portadoras en la sangre, se incluye dentro del término "anticuerpo". También están incluidas dentro de la definición "anticuerpo" por ejemplo las formas de una sola cadena, generalmente denominadas zonas F_v, de anticuerpos con esta especificidad. Preferentemente, pero no necesariamente, los anticuerpos útiles en la invención se producen de forma recombinante, como manipulación de los anticuerpos típicamente murinos o de otros no

humanos con la especificidad apropiada que se necesita para transformarlos en la forma humanizada. Los anticuerpos pueden estar o no glucosilados, aunque se prefieren anticuerpos glucosilados. Los anticuerpos se reticulan de forma apropiada mediante enlaces disulfuro, como es bien sabido.

Es conocido que la unidad estructural de anticuerpo básica comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50 a 70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una zona variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente de la identificación del antígeno. La parte carboxi-terminal de cada cadena define una zona constante responsable principalmente de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican en gamma, mu, alfa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta ó épsilon y definen el isótopo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. En las cadenas ligera y pesada, las zonas variables y constantes están unidas por una zona "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una zona "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos.

Las zonas variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el punto de unión del anticuerpo. De este modo, un anticuerpo intacto tiene dos puntos de unión. Las cadenas presentan todas la misma estructura general de zonas de la estructura (FR) relativamente conservadas unidas por tres zonas hipervariables, denominadas también zonas determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por las zonas de la estructura, permitiendo la unión a un epítrope específico. Desde el terminal N hasta el terminal C, tanto las cadenas ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según convenciones bien conocidas [Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991; Chothia, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia, *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989)].

Como es bien conocido por la técnica, se pueden generar fácilmente anticuerpos monoclonales con especificidad apropiada por técnicas normalizadas de inmunización de mamíferos, que forman hibridomas a partir de las células que producen anticuerpo de dichos mamíferos o si no inmortalizándolas y cultivando los hibridomas o células inmortalizadas para evaluar la especificidad apropiada. En el presente caso dichos anticuerpos se podrían generar inmunizando a un ser humano, un conejo, una rata o un ratón, por ejemplo, con un péptido que representa un epítrope que abarca la zona 13-28 del péptido A β o una subzona apropiada del mismo. Los materiales para la manipulación recombinante se pueden conseguir recuperando las secuencias de nucleótido que codifican el anticuerpo deseado del hibridoma o de otras células que lo producen. Estas secuencias de nucleótido se pueden manipular para proporcionarlas en forma humanizada.

"Anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que se compone parcial o totalmente de secuencias de aminoácido procedentes de una línea germinal de anticuerpo humano alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene zonas determinantes de complementariedad no humana (CDR). Preferentemente, sin embargo, la zona variable del anticuerpo e incluso la CDR está también humanizada por técnicas que son bien conocidas actualmente en la técnica. Las zonas de la estructura de las zonas variables están sustituidas por las zonas de la estructura humanas correspondientes que dejan sustancialmente intactas las CDR no humanas, o incluso reemplazar la CDR con secuencias procedentes de un genoma humano. Se producen anticuerpos totalmente humanos en ratones modificados genéticamente cuyos sistemas inmunitarios han sido alterados para que correspondan con los sistemas inmunitarios humanos. Tal como se mencionó anteriormente, para su uso en los procedimientos de la invención, basta emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo los fragmentos que representan formas de una sola cadena.

Anticuerpo humanizado se refiere de nuevo a un anticuerpo que comprende una estructura humana, por lo menos una CDR de un anticuerpo no humano y en el que cualquier zona constante presente es sustancialmente idéntica a una zona constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85 a 90%, preferentemente al menos 95% idéntica. Por consiguiente, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las correspondientes partes de una o más secuencias humanas de inmunoglobulina natural. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada no abarcaría normalmente un anticuerpo con zona variable híbrida de ratón/zona constante humana.

Los anticuerpos humanizados presentan al menos tres ventajas potenciales sobre los no humanos y los anticuerpos híbridos para su uso en la terapia humana:

1) debido a que la parte efectora es humana, pueden interactuar mejor con otras partes del sistema inmunitario humano (p. ej., destruir las células diana más eficazmente por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o por citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)).

2) el sistema inmunitario humano no debería identificar la estructura o zona C del anticuerpo humanizado como extraño y por lo tanto la respuesta del anticuerpo contra dicho anticuerpo inyectado debería ser menos que contra un anticuerpo no humano totalmente extraño o un anticuerpo híbrido parcialmente extraño.

3) Se ha publicado que los anticuerpos no humanos inyectados tienen una vida media en la circulación humana mucho más corta que la vida media de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán una vida media esencialmente idéntica a los anticuerpos humanos naturales, permitiendo que se administren dosis más pequeñas y menos frecuentes.

5 El diseño de inmunoglobulinas humanizadas se puede realizar de la forma siguiente. Cuando un aminoácido está comprendido en la categoría siguiente, el aminoácido con estructura de inmunoglobulina humana que se debe utilizar (inmunoglobulina aceptora) se sustituye por un aminoácido con estructura de una inmunoglobulina no humana que proporciona CDR (inmunoglobulina donante):

10 a) el aminoácido en la zona de la estructura humana de la inmunoglobulina aceptora es raro para la inmunoglobulina humana en esta posición, mientras que el correspondiente aminoácido en la inmunoglobulina donante es típico en la inmunoglobulina humana en esta posición;

b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a uno de las CDR; o

15 c) cualquier átomo de la cadena lateral de un aminoácido de la estructura está comprendido entre aproximadamente 5 y 6 angstroms (de centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de la CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional [Queen, *et al.*, *op. cit.*, y Co, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2869 (1991)]. Cuando cada uno de los aminoácidos en la zona de la estructura humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es raro en la inmunoglobulina humana en esta posición, dicho aminoácido se sustituye por un aminoácido típico de la inmunoglobulina humana en esta posición.

20 El anticuerpo humanizado es una forma humanizada del anticuerpo 266 monoclonal murino o procedente del anticuerpo 266 monoclonal murino. Los CDR de 266 humanizado tienen las secuencias de aminoácidos de las SEC.ID N.^{os}: 1 a 6

25 Una zona variable de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la que la estructura originada a partir de los segmentos DPK18 de la línea germinal Vk humana y del segmento Jk1 de J, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos de consenso en el mismo subgrupo V humano para reducir la inmunogenicidad potencial:

```

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

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

           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 Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

           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 Xaa Gly Val

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

           110
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg

```

(SEC. ID N.º: 7)

en la que:

30 Xaa en la posición 2 es Val ó Ile;

Xaa en la posición 7 es Ser ó Thr;

Xaa en la posición 14 es Thr ó Ser;
 Xaa en la posición 15 es Leu ó Pro;
 Xaa en la posición 30 es Ile ó Val;
 Xaa en la posición 50 es Arg, Gln ó Lys;
 5 Xaa en la posición 88 es Val ó Leu;
 Xaa en la posición 105 es Gln ó Gly;
 Xaa en la posición 108 es Lys ó Arg; y
 Xaa en la posición 109 es Val ó Leu.

10 Una zona variable de la cadena pesada de un anticuerpo humanizado de la presente invención presenta la secuencia de aminoácidos siguiente, en la que la estructura originada a partir de los segmentos DP53 de la línea germinal VH humana y del segmento JH4 de J, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos de 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			
	20	25	30
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	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			
	80	85	90
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			
	110		
Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser			

15 (SEC. ID N.º: 8)

en la que:

Xaa en la posición 1 es Glu ó Gln;
 Xaa en la posición 7 es Ser ó Leu;
 Xaa en la posición 46 es Glu, Val, Asp ó Ser;
 20 Xaa en la posición 63 es Thr ó Ser;
 Xaa en la posición 75 es Ala, Ser, Val ó Thr;
 Xaa en la posición 76 es Lys ó Arg;
 Xaa en la posición 89 es Glu ó Asp; y
 Xaa en la posición 107 es Leu ó Thr.

Una zona variable de la cadena ligera preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención presenta la secuencia de aminoácidos siguiente, en la que la estructura originada a partir de los segmentos DPK18 de la línea germinal Vk humana y del segmento Jk1 de J, con varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos de consenso en el mismo subgrupo V humano para reducir la inmunogenicidad potencial:

```

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

           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 Ser Gly Thr Asp

           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

5
           110
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

```

(SEC. ID N.º: 9)

Una zona variable de la cadena pesada preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos siguiente, en la que la estructura originada a partir de los segmentos DP53 de la línea germinal VH humana y del segmento JH4 de J:

```

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

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

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

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

           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

10
           110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

```

(SEC. ID N.º: 10)

Una cadena ligera preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención 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
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 Ser Gly Thr	Asp
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
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
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		

(SEC. ID N.º: 11)

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

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
	35		40		45									
Arg	Tyr	Ser	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	50		55		60									
Glu	Leu	Val	Ala	Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr
	65		70		75									
Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
	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
	110		115		120									
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
	125		130		135									
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	140		145		150									
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
	170		175		180									
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
	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
	230		235		240									
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									
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
	290		295		300									
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	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

          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

          365          370          375
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
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

          410          415          420
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

```

(SEC. ID N.º: 12)

5 Son posibles otras secuencias de cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos humanizados de la presente invención y para el 266 humanizado. Las inmunoglobulinas pueden presentar dos pares de complejos de cadena ligera/cadena pesada, comprendiendo al menos una cadena zonas determinantes de complementariedad de ratón operativamente unidas a los segmentos de la zona con estructura humana.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a polinucleótidos recombinantes que codifican anticuerpos que, cuando se expresan, comprenden las CDR de las cadenas pesada y ligera procedentes de un anticuerpo de la presente invención. En cuanto a la zona del sistema humano, se compara un sistema o secuencia de aminoácidos de la zona variable de una inmunoglobulina no humana que proporciona la CDR con las secuencias correspondientes en un conjunto de secuencias con zona variable de inmunoglobulina humana y se selecciona una secuencia que tiene un alto porcentaje de aminoácidos idénticos. En las Figuras 4 y 5 se proporcionan ejemplos de polinucleótidos, que comprenden en el código de expresión para las cadenas de polipéptidos las CDR de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 266 monoclonal. Debido a la degeneración del codón y a las sustituciones de aminoácidos no críticas, se pueden sustituir fácilmente otras secuencias de polinucleótidos por aquellas secuencias. Los polinucleótidos particularmente preferidos de la presente invención codifican anticuerpos, que cuando se expresan, comprenden las CDR de la SEC. ID N.º: 1 - SEC. ID N.º: 6, o cualquiera de las zonas variables de las SEC. ID N.º: 7 - SEC. ID N.º: 10, o las cadenas ligera y pesada de las SEC. ID N.º: 11 y SEC. ID N.º: 12.

20 Los polinucleótidos incluirán además normalmente una secuencia de polinucleótidos de control de expresión ligada a las secuencias que codifican la inmunoglobulina humanizada, incluyendo las zonas del activador asociadas de forma natural o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de expresión serán sistemas del activador eucariótico en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucarióticas, pero también se pueden utilizar las secuencias de control para los huéspedes procarióticos. Una vez el vector se ha incorporado a la línea celular del huésped apropiada, la célula huésped se propaga en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y, como es de desear, puede seguir la recogida y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos íntegros, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina.

30 Las secuencias de nucleótidos de la presente invención capaces de expresar por último los anticuerpos humanizados deseados se pueden formar a partir de una variedad de diferentes polinucleótidos (ADNc o genómico, ARN, oligonucleótidos de síntesis, etc.) y componentes (p. ej., zonas V, J, D y C) así como a partir de una variedad de técnicas diferentes. La unión de secuencias genómicas y sintéticas apropiadas es un procedimiento habitual de producción, pero se pueden también utilizar secuencias de ADNc.

Se pueden aislar secuencias de ADN de la zona constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferentemente a partir de los linfocitos B inmortalizados. Las CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención procederán asimismo de anticuerpos monoclonales no humanos capaces de unirse a un epítipo entre los aminoácidos 13 y 28 del péptido A β , anticuerpos monoclonales que se producen en cualquier procedencia de mamífero adecuada, incluyendo, ratones, ratas, conejos u otros vertebrados capaces de producir anticuerpos por procedimientos bien conocidos, tal como se describió anteriormente. Se pueden obtener células de procedencias adecuadas para las secuencias de polinucleótidos y células huésped para la expresión y secreción de inmunoglobulina a partir de numerosas fuentes bien conocidas en la técnica.

Además de las inmunoglobulinas humanizadas descritas en esta memoria, se pueden diseñar fácilmente otras inmunoglobulinas modificadas "sustancialmente homólogas" y prepararse utilizando varias técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las zonas de la estructura pueden oscilar desde las secuencias naturales en el nivel de la estructura primaria por diversas sustituciones de aminoácidos, adiciones y deleciones terminales e intermedias y similares. Además, se puede utilizar diferentes zonas de la estructura humana solas o en combinación como base para las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención. En general, las modificaciones de los genes se pueden realizar fácilmente por una variedad de técnicas bien conocidas, tal como la mutagénesis dirigida al sitio.

Alternativamente, se pueden producir fragmentos de polipéptido que comprenden solamente una parte de la estructura primaria del anticuerpo, fragmentos que poseen una o más actividades de la inmunoglobulina (p. ej. la actividad de fijación del complemento). Estos fragmentos de polipéptido se pueden producir por escisión proteolítica de anticuerpos intactos por procedimientos bien conocidos en la técnica o insertando codones de terminación en las posiciones deseadas en los vectores que utilizan mutagénesis dirigida al sitio, tal como después que CH1 produce fragmentos de Fab o después de la zona bisagra para producir fragmentos F(ab')₂. Se pueden producir anticuerpos con una sola cadena uniendo VL y VH con el conector de ADN.

Tal como se indicó anteriormente, las secuencias de nucleótido codificadoras se expresarán en los huéspedes después que las secuencias se han unido operativamente a (es decir, situado para asegurar el funcionamiento de) una secuencia de control de expresión. Estos vectores de expresión se replican normalmente en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte íntegra del ADN cromosómico del huésped. Frecuentemente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, p. ej., tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

E. coli es un anfitrión procariótico particularmente útil para clonar los polinucleótidos de la presente invención. Otros anfitriones microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tal como *Bacillus subtilis* y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia* y varias especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procarióticos, se puede preparar también vectores de expresión, que contendrán normalmente las secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (p. ej., origen de replicación). Además, puede estar presente cualquiera de los numerosos activadores bien conocidos, tal como el sistema activador de la lactosa, un sistema activador de triptófano (trp), un sistema activador de beta-lactamasa, o un sistema activador del fago lambda. Los activadores controlarán normalmente la expresión, opcionalmente con una secuencia de activador y tienen secuencias del sitio que se une al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

Se pueden utilizar también otros microbios, tal como las levaduras, para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped preferido, con vectores adecuados que presentan secuencias de control de la expresión, tal como los activadores, incluyendo 3-fosfoglicerato-quinasa u otros enzimas glucolíticos y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares como es deseable.

Además de los microorganismos, se puede utilizar también el cultivo celular del tejido del mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la invención. Las células eucarióticas se prefieren actualmente, porque se han desarrollado en la técnica numerosas líneas celulares anfitrionas adecuadas de inmunoglobulinas intactas segregadoras e incluyen las líneas celulares CHO, varias líneas celulares COS, las líneas celulares del ovario del hámster sirio, células HeLa, preferentemente las líneas celulares del mieloma, linfocitos B transformados, líneas celulares del riñón embrionario humano o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tal como un origen de replicación, un activador, un potenciador y si es necesario puntos de información del tratamiento, tales como los puntos de unión del ribosoma, los puntos de corte y empalme del ARN, los puntos de poliadenilación y las secuencias finales de la transcripción. Las secuencias de control de expresión preferidas son los activadores procedentes de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares.

Los vectores que contienen las secuencias de nucleótido en cuestión (p. ej., las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera y las secuencias de control de expresión) se pueden transformar en la célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían en función del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza normalmente para las células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato cálcico o electroporación se puede utilizar para otros huéspedes celulares.

Una vez expresados, se pueden purificar todos los anticuerpos, sus dímeros, cada una de las cadenas ligera y pesada u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención según los procedimientos habituales de la técnica, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico, afinidad, cromatografía en columna por interacción hidrófoba en fase inversa, electroforesis en gel y similares. Se prefieren las inmunoglobulinas prácticamente puras de por lo menos aproximadamente entre 90 y 95% de homogeneidad y entre el 98 y el 99% o más de homogeneidad es la más preferida, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad tal como es deseable, entonces se pueden utilizar los polipéptidos terapéutica o profilácticamente, tal como se indica en esta memoria.

Los anticuerpos (incluyendo los fragmentos inmunológicamente reactivos) se administran a un paciente con riesgo o que presenta síntomas o patología relacionada con $A\beta$ tales como el cuadro clínico o preclínico de Alzheimer, el síndrome de Down o la angiopatía amiloide clínica o preclínica, utilizando técnicas de administración habituales, preferentemente administración periférica (es decir, no mediante administración en el sistema nervioso central) por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. Aunque los anticuerpos se pueden administrar directamente en el sistema ventricular, el fluido espinal o el parénquima cerebral y las técnicas para tratar estas posiciones son bien conocidas en la técnica, no es necesario utilizar estos procedimientos más difíciles. Los anticuerpos de la invención son eficaces cuando se administran por técnicas más sencillas que se basan en el sistema de circulación periférica. Las ventajas de la presente invención incluyen la capacidad del anticuerpo para ejercer sus efectos beneficiosos aun cuando no se proporcionen directamente al propio sistema nervioso central. De hecho, se ha demostrado en esta memoria que la cantidad de anticuerpo que atraviesa la barrera sangre-cerebro es $<0,1\%$ de las concentraciones en el plasma y que los anticuerpos de la invención ejercen su capacidad para secuestrar $A\beta$ en la circulación periférica así como de alterar el SNC y la eliminación de $A\beta$ soluble en el plasma.

Las composiciones farmacéuticas para administración se diseñan para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado y los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como los agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares se utilizan de forma apropiada. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton PA, última edición, incorporada en esta memoria por referencia, proporciona un compendio de técnicas de formulación tal como son conocidas en general por los médicos. Puede ser particularmente útil alterar las características de solubilidad de los anticuerpos de la invención, haciéndoles más lipófilos, por ejemplo, encapsulándoles en liposomas o bloqueando los grupos polares.

Se prefiere la administración generalizada periférica por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Los vehículos adecuados para dichas inyecciones son sencillos. Además, sin embargo, la administración se puede efectuar también a través de las membranas de la mucosa por medio de aerosoles nasales o supositorios. Las formulaciones adecuadas para dichos modos de administración son bien conocidas e incluyen normalmente tensioactivos que facilitan la transferencia a través de la membrana. Dichos tensioactivos con frecuencia proceden de esteroides o son lípidos catiónicos, tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o varios compuestos tales como hemisuccinato de colesterol, fosfatidil glicerol y similares.

La concentración de anticuerpo humanizado en las formulaciones que puede ser tan larga como aproximadamente entre 0,1% y como mucho el 15 ó 20% en peso se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes, viscosidades del fluido y así sucesivamente, según el modo concreto de administración seleccionado. De este modo, se podría preparar una composición farmacéutica típica para inyectables conteniendo 1 ml de agua tamponada esterilizada de solución tamponada con fosfato y 1 a 100 mg del anticuerpo humanizado de la presente invención. La formulación se podría filtrar esterilizada después de preparar la formulación, o si no hacerla microbiológicamente aceptable. Una composición típica para infusión intravenosa podría tener un volumen como mucho de 250 ml de fluido, tal como una solución de Ringer esterilizada, y 1 a 100 mg por ml o más de concentración de anticuerpo. Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar para almacenamiento y redisolverse en un vehículo esterilizado adecuado antes de su uso. La liofilización y redisolución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo (p. ej. con inmunoglobulinas convencionales, anticuerpos IgM que tienden a tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos de IgG). Las dosis pueden que se tengan que ajustar para compensar. El pH de la formulación se seleccionará para equilibrar la estabilidad del anticuerpo (química y física) y aliviar al paciente cuando se le administra. En general, se tolera un pH entre 4 y 8.

Aunque los procedimientos anteriores parecen los más convenientes y más apropiados para la administración de proteínas tales como anticuerpos humanizados, mediante adaptación adecuada, se pueden emplear otras técnicas de administración, tales como la administración transdérmica y la administración oral con la condición de que se diseñe la formulación apropiada.

Además, puede ser deseable emplear formulaciones de liberación lenta utilizando películas y matrices biodegradables o minibombas osmóticas o sistemas de administración basados en granos de dextrano, alginato o colágeno.

En resumen, están disponibles las formulaciones para administrar los anticuerpos de la invención y son bien conocidas en la técnica y se pueden seleccionar a partir de varias opciones.

Se pueden optimizar las concentraciones de dosificación típicas utilizando técnicas clínicas habituales y dependerán del modo de administración y de la enfermedad del paciente.

Los ejemplos siguientes están destinados a ilustrar pero no limitar la invención.

Los ejemplos siguientes en esta memoria emplean, entre otros, un anticuerpo monoclonal murino denominado "266" que se preparó inicialmente por inmunización con un péptido compuesto de los restos 13 a 28 del péptido A β humano. Se confirmó que el anticuerpo inmunorreacciona con este péptido, aunque se había descrito anteriormente que no reacciona con el péptido que contiene solo los restos 17 a 28 del péptido A β humano, o con cualquiera de los demás epítomos en el mismo péptido A β . La fabricación de este anticuerpo se describe en la patente U.S. n° 5.766.846, incorporada en esta memoria por referencia. Como los ejemplos describen en esta memoria los experimentos realizados en los sistemas murinos, el uso de anticuerpos monoclonales murinos es satisfactoria. Sin embargo, en los procedimientos de tratamiento de la invención destinados a uso humano, se prefieren las formas humanizadas de los anticuerpos con la correspondiente inmunoespecificidad del anticuerpo 266.

Ejemplo 1

Secuestro del péptido A β añadido en fluidos humanos

Se incubaron muestras de fluido cerebroespinal humano (CSF) (50 μ l) y plasma humano (50 μ l) durante 1 hora a temperatura ambiente de la forma siguiente:

1. solo;
2. junto con 5 ng de péptido A β 40; ó
3. 5 ng de péptido A β 40 más 1 mg de anticuerpo 266 monoclonal (descrito, por ejemplo, en la patente U.S.n.° 5.766.846 incorporada en esta memoria por referencia).

Se realizó la electroforesis en las muestras en 4 a 25% de gel con gradiente no desnaturizante, es decir, electroforesis con gradiente no desnaturizante (NDGGE) y se transfirieron a nitrocelulosa. Las transferencias se tiñeron a continuación con Ponceau S o, para transferencia de Western, se sondaron con anticuerpo monoclonal (3D6) marcado con biotina que se dirige contra los primeros cinco aminoácidos del péptido A β , se revelaron con peroxidasa de rábano picante con estreptavidina y se detectaron por el aumento de quimioluminiscencia (ECL). Se estimaron los diámetros hidratados de los materiales contenidos en las bandas en las transferencias utilizando marcadores de peso molecular de Pharmacia. De este modo, si el péptido A β se une a otras moléculas, lo haría con el tamaño del complejo resultante.

Las transferencias Western de CSF ya sea con o sin 5 ng de péptido A β no presentan pruebas del péptido A β en respuesta a la detección mediada por el anticuerpo 3D6. Similares resultados se obtienen para el plasma humano. Esto es cierto a pesar de que el péptido A β se podría detectar por SDS-PAGE seguido de transferencia Western utilizando la misma técnica y en las mismas muestras de CSF. Supuestamente, la detección del péptido A β se impidió por interacciones entre este péptido y otros factores en los fluidos probados. Sin embargo, cuando se añade Mab 266 a la incubación, están presentes bandas características que representan el péptido A β secuestrado a complejadas con el anticuerpo tanto en el plasma como en CSF. La banda principal es de aproximadamente 11 nm de diámetro hidratado, correspondiente al monómero del anticuerpo con una banda adicional más pequeña a 13 nm correspondiente al dímero del anticuerpo.

Ejemplo 2

Especificidad del anticuerpo secuestrante

Se utilizaron muestras conteniendo 50 μ l de CSF humano ó 10 μ l de CSF de APP^{V717F}. APP^{V717F} son ratones transgénicos que representan un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer en los cuales se expresa el transgen de la proteína del precursor amiloide humano con una mutación de la enfermedad familiar de Alzheimer y da como resultado la producción del péptido A β humano en el sistema nervioso central.

Se incubaron las muestras con o sin varios Mabs (1 μ g) durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se realizó la electroforesis en un NDGGE del 4 al 25% y se hizo la transferencia sobre microcelulosa, tal como se describe en el Ejemplo 1. Los anticuerpos fueron los siguientes:

- Mab 266 (se une en las posiciones 13 a 28);
- Mab 4G8 (se une en las posiciones 17 a 24);
- QCBpan (policlonal de conejo para las posiciones 1 a 40);
- IgG de ratón (no específica);
- Mab 3D6 (se une a las posiciones 1 a 5);

Mab 21F12 (se une a las posiciones 33-42);

Mab 6E10 (se une a las posiciones 1 a 17); y

QCB_{40,42} (policlonales de conejo para A β ₄₀ y A β ₄₂).

- 5 La detección del complejo anticuerpo péptido A β fue tal como se describe en el Ejemplo 1 3D6 marcado con biotina (en el péptido A β N-terminal) seguido de estreptavidina-HRP y ECL. La detección similar en CSF humano incubado con Mab 266, en algunos casos sustituyó a QCB_{40,42}, que se une al terminal carboxilo del péptido A β , por 3D6.

Los resultados demostraron que de los anticuerpos ensayados, solamente Mab 4G8 y Mab 266 permitieron la detección del péptido A β .

- 10 Los resultados demostraron que para el CSF humano, únicamente Mab 266 y Mab 4G8 pudieron secuestrar en cantidades detectables un complejo A β de anticuerpo (de nuevo, sin ningún anticuerpo, no se detecta A β). Mab 266 pudo producir también resultados similares a los obtenidos con el CSF humano con CSF de ratones transgénicos APP^{V717F}. El péptido A β se podría secuestrar en el CSF humano utilizando Mab 266 independientemente de si se utilizó anticuerpo 3D6 o QCB_{40,42} para desarrollar la transferencia Western.

Ejemplo 3

15 Demostración del complejo péptido A β -266 por electroforesis bidimensional

Se incubó una muestra conteniendo 50 ng de péptido A β ₄₀ con 2 β g de Mab 266 a 37°C durante 3 horas. Se utilizó una incubación correspondiente de Mab 266 solo como control.

Se sometieron las muestras a continuación a electroforesis bidimensional en gel.

- 20 En la primera dimensión, se sometieron las muestras incubadas a NDGGE como se describe en el Ejemplo 1. El gel de poliácridamida se cortó a continuación en bandas individuales perpendiculares a la dirección del primer flujo dimensional y se realizó la separación del gel en condiciones desnaturalizantes/reductoras por SDS-PAGE (gel de tricina urea) en la segunda dimensión. Se detectó la presencia de las bandas por coloración de Ponceau-S (cualquier proteína) o por revelado específico utilizando 6E10 Mab (Senetek, Inc.) y A β anti-ratón biotinilado en el sistema de detección por HRP.

- 25 La coloración de Ponceau-S de las transferencias en nitrocelulosa después de la transferencia permitió la observación de las cadenas pesada y ligera de Mab 266 solo. Se confirmó que el péptido A β estaba en un complejo con Mab 266 como una banda a 4 kD, se observó que se alinea con el tamaño del Mab 266 completo observado después de la NDGGE de la primera dimensión.

Ejemplo 4

Demostración de la no equivalencia de unión y secuestro

- 30 Se cree que el péptido A β a medida que circula en el plasma y en el CSF está contenido en un complejo con proteínas, incluyendo apolipoproteína E. El presente ejemplo demuestra que los anticuerpos contra apoE, aunque pueden unirse al complejo, no secuestran apoE del resto del complejo.

- 35 Se incubaron complejos apoE (500 ng) con Mab o anticuerpos policlonales contra apoE (2 β g) a 37°C durante una hora. Se sometieron a continuación las muestras incubadas a NDGGE utilizando las técnicas descritas en el Ejemplo 1. Después de NDGGE, se realizó la transferencia Western con anticuerpos anti-apoE de cabra purificados por afinidad con detección por ECL. Cuando no está presente el anticuerpo, se puede detectar apoE a 8 a 13 nm acorde con presencia en las partículas de lipoproteína. La presencia de anticuerpos monoclonales o policlonales contra apoE produce un desplazamiento de la población de apoE a una especie molecular mayor, un "superdesplazamiento". Esto demuestra que los anticuerpos contra apoE no secuestraron, es decir, eliminaron apoE de una partícula de lipoproteína, en lugar de unirse a apoE en las lipoproteínas creando una especie molecular mayor.
- 40

Ejemplo 5

Secuestro de A β no está alterado por anticuerpos anti-apoE

- 45 Se incubó una muestra de 100 β l de CSF humano con Mab 266 solo o con anti-apoE policlonal o con ambos anticuerpos durante 60 minutos a 37°C. Se analizaron a continuación las muestras por NDGGE como se describe en el Ejemplo 1 y se realizó la detección de las bandas como se describe en el Ejemplo 1.

- 50 Los resultados demuestran que añadiendo Mab 266 a la muestra, la banda de aproximadamente 11 nm de diámetro característica del complejo del péptido 266-A β secuestrado era visible. Esto es en caso de que el anti-apoE esté o no presente. Esta banda, que demuestra A β secuestrado, también aparece si se añade 50 ng de A β a la mezcla de incubación en presencia de Mab 266. De este modo, la alteración del peso molecular de apoE en presencia de anticuerpos anti-apoE no interfiere con el secuestro del péptido A β por Mab 266.

Ejemplo 6

Secuestro del péptido A β *in vivo*

A. Los ratones APP^{V717F} transgénicos, denominados también ratones PDAPP, sobreexpresan una forma mutante de proteína APP humana. Estos ratones producen A β humano en el SNC y tienen concentraciones elevadas de péptido A β humano que circula en el CSF y en el plasma. Se inyectaron ratones de 8 meses por vía intravenosa con solución salina o con 100 μ g de Mab 266. Se extrajo sangre 10 minutos después de la inyección inicial y de nuevo a las 20 horas después de la inyección inicial.

Se analizaron las muestras que contenían 20 μ l de plasma en cada animal por NDGGE y transferencia Western con anticuerpo 3D6 como se describe en el Ejemplo 1. Los animales inyectados con solución salina no presentaban la presencia del péptido A β secuestrado de 11 nm característica después de 10 minutos o 20 horas. Sin embargo, los dos animales a los que se inyectó con Mab 266 no presentaban el aspecto de esta banda después de 20 horas.

B. En este estudio se utilizaron ratones APP^{V717F} de dos meses. El día 0, los ratones no recibieron nada de Mab 266, recibieron 1 mg de Mab 266 ó 100 μ g de este anticuerpo. Se extrajeron muestras de plasma dos días antes de la administración de los anticuerpos y los días 1, 3, 5 y 7. Se sometieron las muestras de plasma a NDGGE seguido de transferencia Western y detección con 3D6 como se describe en el Ejemplo 1. Se detectó el complejo 266/A β en todos los puntos de tiempo después de la administración de Mab 266 a menos que la muestra de plasma se hubiera tratado con proteína G, que se une a la inmunoglobulina, eliminando de este modo de forma eficaz el Mab 266. Se observaron concentraciones constantes del complejo durante el periodo de tiempo ensayado excepto para una pequeña disminución el séptimo día en los animales inyectados con 100 μ g de Mab 266; en general, las concentraciones en los animales a los que se administró 100 μ g fueron constantemente menores que las observadas en los ratones a los que se administró 1 mg de este anticuerpo.

C. Se administraron a dos ratones APP^{V717F} de dos meses 1 mg de Mab 266 por vía intravenosa y se extrajo una muestra de 25 μ l de plasma de cada uno. Se sometió la muestra de plasma a NDGGE seguido de transferencia Western tal como se describió anteriormente excepto que la unión con 3D6 biotinilado fue seguida de detección con estreptavidina ¹²⁵I (Amersham) y exposición a una pantalla de imagen fosforescente. Se estimó la concentración de complejo en comparación con una curva patrón utilizando cantidades conocidas de A β 40 acomplejado con concentraciones de saturación de Mab 266 y se detectó de igual modo. Se estimó la cantidad de péptido A β unido a Mab 266 a aproximadamente 100 ng/ml, representando un aumento de aproximadamente 1.000 veces sobre el péptido A β endógeno en estos ratones a los que se había determinado que era aproximadamente 100 pg/ml. Esta es también similar a la concentración del péptido A β en el cerebro de APP^{V717F} antes de la deposición de A β (50 a 100 ng/g); APP humano y A β humano en ratones APP^{V717F} Tg se producen casi solamente en el cerebro. De este modo, parece que la presencia de Mab 266 en el plasma actúa como un sumidero de péptido A β facilitando la salida neta de péptido A β del SNC en el plasma. Este aumento de salida neta procede probablemente tanto de aumentar la salida de A β del SNC al plasma como también de impedir que A β vuelva a entrar en el plasma al cerebro.

Se confirmó el tamaño correcto para el péptido A β secuestrado introduciendo 20 β L de muestras de plasma obtenidas de ratones APP^{V717F} 24 horas después de estar inyectados con 1 mg Mab 266 en geles de SDS-PAGE con TRIS- tricina seguido de transferencia Western utilizando anticuerpo 6E10 anti-A β antes o después de la exposición a la proteína G utilizando bolas unidas a la proteína G. Se detectó una banda que fue eliminada por la proteína G a 4-8 kD, acorde con la presencia de monómeros y posiblemente dímeros del péptido A β .

D. Se trataron ratones APP^{V717F} de dos meses con PBS (n=7) ó 500 μ g de Mab 266 biotinilado, es decir, m266B (n=9) por vía intraperitoneal. Tanto antes como a las 24 horas de la inyección, se analizó el péptido A β total en el plasma utilizando una modificación del procedimiento ELISA de Jonhson-Wood, K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:1550-1555; y Bales, K.R., *et al.*, *Nature Genet* (1997) 17:263-264. Se determinó el A β total unido a m266B utilizando placas ópticas de 96 pocillos (Packard, Inc.) recubiertas con m3D6. Se diluyeron las muestras de plasma y se incubaron patrones (concentraciones variables de A β 40 y m266B) toda la noche en placas recubiertas y se determinó la cantidad de complejo A β /m266B total utilizando ¹²⁵I-estreptavidina. Además, en el punto de tiempo de 24 horas, se trataron en primer lugar las muestras de plasma con proteína G para cuantificar el péptido A β no unido a Mab 266 y se determinó A β _{total} y A β ₄₂ por ELISA en el CSF. En los animales inyectados con PSB, las concentraciones de péptido A β en el plasma fueron 140 pg/ml tanto antes como después de la inyección. Las concentraciones de plasma fueron similares en los ratones inyectados con Mab 266 antes de la inyección, pero las concentraciones de péptido A β no unido a Mab 266 fueron indetectables 24 horas después de la inyección.

Se midieron también las concentraciones en el CSF, CSF representa un compartimento extracelular dentro del SNC y la concentración de las moléculas en el CSF refleja en cierta medida la concentración de las sustancias en el espacio extracelular del cerebro. Se aisló CSF del compartimento de la cisterna magna. Se anestesiaron ratones con pentobarbital y se extrajo la musculatura de la base del cráneo hasta la primera vértebra. Se extrajo CSF pinchando con cuidado la membrana aracnoidea que cubre la cisterna con una microaguja bajo un microscopio de disección y

extrayendo el CSF con una micropipeta de polipropileno. 24 horas después de la inyección, se observó un aumento del péptido A β total en el CSF de los ratones inyectados con Mab 266 y se obtuvo aproximadamente un aumento al doble en A β ₄₂ en comparación con los ratones inyectados con PBS en el CSF. Esto se confirmó utilizando electroforesis en gel desnaturalizante seguida de transferencia Western con anticuerpo 21F12 específico de A β ₄₂.

- 5 En otro experimento, se inyectaron ratones APP^{V717F} Tg de tres meses con PBS o Mab 266 por vía intravenosa y se evaluaron las concentraciones tanto de A β ₄₀ como de A β ₄₂ en el CSF de la forma siguiente:

Para la medición de A β ₄₀, se utilizó el anticuerpo monoclonal m2G3, específico de A β ₄₀. Se modificó el ELISA descrito (Jonhson-Wood, K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:1550-1555) en un RIA sustituyendo el reactivo estreptavidina-HRP con ¹²⁵I-estreptavidina. Para las muestras de plasma y CSF, se realizó el procedimiento en condiciones no desnaturalizantes que carecen de guanidina en los tampones. Para la evaluación del carbonato soluble y del A β insoluble en homogeneizado de cerebro, se homogeneizaron muestras con carbonato 100 mM, NaCl 40 mM, pH 11,5 (4°C), se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min y se evaluó el A β en el sobrenadante (soluble) y en las fracciones de sedimento (insoluble) según describe (Jonhson-Wood, K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:1550-1555) y se citó en la lista anteriormente. Se realizó la medición del complejo A β /Mab 266 en el plasma por RIA modificado. Se inyectaron ratones con Mab 266 biotinilado (Mab 266B) y se aisló plasma en diversos puntos de tiempo. Se midió el A β total unido a Mab 266 utilizando placas ópticas de 96 pocillos (Packard, Inc.) recubiertas con m3D6. Se incubaron muestras de plasma diluido y patrones (concentraciones variables de A β ₄₀ y de Mab 266B) toda la noche en las placas recubiertas y se determinó la cantidad de complejo A β /Mab 266B total mediante el uso de ¹²⁵I-estreptavidina.

- 20 Tres horas después de la inyección intravenosa de Mab 266, hubo un aumento al doble de las concentraciones de A β ₄₀ en CSF y un aumento no significativo en A β ₄₂. Sin embargo, tanto a las 24 como a las 72 horas hubo un aumento al doble o triple tanto en A β ₄₀ como en A β ₄₂ en el CSF. Se obtuvieron resultados similares utilizando análisis de gel desnaturalizante seguido de transferencia Western en A β del CSF mezclado. La salida de A β a través del fluido intersticial del cerebro, que se refleja en cierto grado en las concentraciones de CSF, justifica probablemente el aumento observado en A β de CSF.

- 25 Resulta significativo que el cambio en las concentraciones del péptido A β en CSF no puede ser debido a la introducción de Mab 266 en el CSF ya que las concentraciones medidas 24 horas después de la inyección, que son menores a 0,1% de las concentraciones en el plasma de Mab 266, son insuficientes para justificar los cambios. Estos resultados sugieren que el péptido A β es extraído del parénquima cerebral en el CSF por la presencia del anticuerpo en el torrente sanguíneo.

- 30 Se midieron las formas de péptido A β que son solubles en PBS o en tampón de carbonato en homogeneizados corticales del cerebro en los mismos ratones a los que se había inyectado con Mab 266 y en los que se analizaron en el CFS como se describió anteriormente. Se observaron aumentos similares en estas formas solubles en los homogeneizados corticales.

35 Ejemplo 7

Mab 266 actúa como sumidero del péptido A β *in vitro*

- Se construyó una cámara de diálisis como sistema *in vitro* para determinar la capacidad de Mab 266 para actuar como sumidero del péptido A β . Se colocó 1 ml de CSF humano en la cámara superior de un tubo de polipropileno separada por una membrana de diálisis con un umbral específico del orden de 10 a 100 kD en una cámara en el fondo que contenía 75 μ l de PBS con o sin 1 μ g de Mab 266.

- 40 Parece que se alcanzó el equilibrio después de 3 horas, según se determinó al someter al material en la cámara de fondo a geles de urea ácidos seguido de transferencia Western para el péptido A β con 6E10 en varios puntos de tiempo. Se desnaturalizaron las muestras en ácido fórmico hasta una concentración final del 80% (vol/vol) y se redujeron con β -mercaptoetanol (1%). Se realizó la electroforesis de las muestras (ánodo a cátodo) en ácido acético 0,9 M pasando el tampón de gradiente de gel de poliacrilamida desde un 4% al 35% conteniendo urea 6 M, ácido acético glacial al 5% (vol/vol) y TEMED al 2,5%. Se neutralizó el pH ácido del gel antes de transferir a la nitrocelulosa. Posteriormente, se utilizaron técnicas de transferencia Western habituales para identificar A β . Las bandas detectadas corresponden a 4 kD.

- 50 La cantidad de A β eliminada de la cámara superior se determinó de este modo por análisis ELISA tanto de la cámara superior como inferior (n=4) después de 3 horas. En la Figura 1 se muestran los resultados de varios umbrales de peso molecular en presencia y ausencia de Mab 266. Como se muestra, mientras que solamente cantidades mínimas de péptido A β atravesaron la membrana cuando se colocó PBS en la cámara inferior, se secuestró el 50% de péptido A β en la cámara del fondo cuando Mab 266 estaba presente y el umbral de peso molecular era de 25 kD; cantidades crecientes atravesaron a medida que el umbral de peso molecular aumentaba hasta 100 kD, cuando casi el 100% del péptido A β atravesó la membrana.

Se observó también que los anticuerpos 3D6 y 10D5 de A β anti-N-terminal pudieron extraer el péptido A β a través de la membrana en este sistema, aunque no pudieron secuestrar el péptido A β en los ensayos descritos en el Ejemplo 1.

Estos resultados demuestran que los anticuerpos contra el péptido A β tienen suficiente afinidad en estas condiciones para secuestrar el péptido en soluciones fisiológicas distintas de otras proteínas de unión, pero que los Mab tales como 266 que son inmunorreactivos con un epitope en las posiciones 13 a 28 son prácticamente más eficaces y se unen con mayor afinidad.

- 5 En ensayos similares, apoE4 segregada por astrositos que se purificó según describe DeMattos, R.B., *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1998) 273:4206-4212; Sun, Y., *et al.*, *J. Neurosci.* (1998) 18:3261-3272 presentó un pequeño efecto estadísticamente significativo al aumentar la masa de péptido A β en la cámara inferior. No se observó ningún perjuicio cuando IgG ó BSA policlonales se sustituyeron por Mab 266.

Ejemplo 8

10 Flujo de péptido A β en el plasma en el SNC

15 A. Se disolvió 1 μ g de A β ₄₀ en 5 β L de CSF de rata para mantenerlo soluble y se inyectó a continuación en el espacio subaracnoideo de la cisterna magna de ratones Swiss-Webster salvajes que habían recibido anteriormente inyecciones IV de PBS (n=3) o 200 μ g de Mab 266 (n=3) biotinilado. En diferentes intervalos de tiempo siguiendo el tratamiento, se determinó A β _{Total} en el plasma de los ratones por ELISA de A β , utilizando 3D6 como anticuerpo de recubrimiento y patrones de A β mezclados con un exceso de 266 biotinilado. Cada muestra de plasma se enriqueció con un exceso de 266 biotinilado después de la extracción en cada animal para la detección de A β en ELISA. En los ratones inyectados con PBS, se detectaron cantidades mínimamente detectables del péptido a concentraciones de 0,15 ng/ml como valores pico después de 30 a 60 minutos, después de lo cual las concentraciones fueron prácticamente cero. En los ratones a los que se administró Mab 266, sin embargo, el péptido A β en el plasma alcanzó concentraciones 330 veces mayores que las detectadas en los ratones inyectados con PBS después de 60 minutos (aproximadamente 50 ng/ml) y valores alcanzados de aproximadamente 90 ng/ml después de 180 minutos.

25 B. Se repitió este procedimiento utilizando bien 200 μ g (n=3) o 600 β g (n=3) inyectado IV en ratones APP^{V717F} de dos meses. Se inyectó Mab 266 por vía intravenosa en ratones APP^{V717F} +/- de 3 meses con las dosis anteriores. Antes y en diferentes puntos de tiempo después de la inyección intravenosa, se determinó por RIA la concentración en el plasma de A β ligada a Mab 266. Los resultados detallados en un ratón ilustrativo se presentan en la Figura 2.

Se observó que la concentración de A β ligado en el anticuerpo monoclonal Mab 266 aumentaba desde niveles basales de 150 pg/ml a concentraciones mayores de 100 ng/ml durante cuatro días. Analizando los puntos de tiempo iniciales en la curva, se determinó que el ritmo neto de entrada de A β _{Total} en el plasma de ratones APP^{V717F} Tg era de 42 pg/ml/minuto en presencia de concentraciones de saturación del anticuerpo.

Los efectos de Mab 266 sobre las concentraciones de A β en el plasma tanto en ratones salvajes como APP^{V717F} Tg así como los efectos del anticuerpo sobre la concentración de A β en CSF demuestra que la presencia de Mab 266 en circulación produce un cambio en el equilibrio del flujo de A β o en el transporte entre el SNC y el plasma.

Ejemplo 9

35 Efecto de Mab 266 sobre A β en el cerebro

Se trataron ratones APP^{V717F} +/- de cuatro meses cada 2 semanas durante 5 meses con inyecciones por vía intraperitoneal de solución salina, Mab 266 (500 μ g) o IgG para ratón de control (100 μ g, Pharmigen). Se sacrificaron los ratones a los nueve meses de edad y se determinó la deposición de A β en la corteza cerebral. Se cuantificó el % de área cubierta por inmunoreactividad de A β , identificada con un anticuerpo pan-A β de conejo (QCB, Inc.), en la corteza cerebral cubriendo el hipocampo dorsal tal como describe Holtzman, D.M., *et al.*, *Ann. Neurol.* (2000) 97:2892-2897. Los resultados se presentan en la Figura 3A. A esta edad, aproximadamente la mitad de cada grupo no había comenzado todavía a desarrollar la deposición de A β . Sin embargo, el % de ratones con >50% de carga de A β en la corteza cerebral fue significativamente menor (P=0,02, prueba de la Ji al cuadrado) en el grupo tratado con 266. Aunque los ratones APP^{V717F} pueden desarrollar grandes cantidades de depósitos de A β en nueve meses, existe gran variabilidad en aproximadamente el 50% que no presentan depósitos y aproximadamente el 50% que presentan depósitos sustanciales. En los animales tratados con PBS e IgG, 6/14 y 5/13 ratones tenían más del 50% de la corteza cerebral recubierta por coloración de A β , mientras que solamente uno de los 14 ratones tratados con Mab 266 tenía este nivel de coloración. Casi el 50% de los animales en todos los grupos no había desarrollado todavía deposición de A β a los 9 meses. Esto último parece que es debido al origen paterno de cada ratón en nuestra cohorte ya que aun cuando todos los ratones estudiados se confirmó que eran APP^{V717F} +/-, se observaron grandes concentraciones de deposición de A β solamente en los ratones procedentes de 4/8 parejas de crías (camadas con alta patología). Los ratones procedentes de las otras 4 parejas de cría estaban prácticamente exentos de depósitos de A β (camadas con baja patología). Utilizando el origen paterno como covariable, existía un fuerte efecto significativo de m266 en la reducción de la deposición de A β (p=0,0082, Fig. 3B).

55 Ejemplo 10

Mab 266 inyectado periféricamente no se une a las placas en ratones APP^{V717F} Tg

Para determinar si el Mab 266 inyectado por vía intraperitoneal durante 5 meses se unió A β en el cerebro, se utilizaron secciones de cerebro de ratones APP^{V717F/+} Tg de 9 meses que contenían depósitos A β y habían sido tratados ya sea con Mab 266, solución salina o IgG de control. Se realizó el tratamiento del tejido y las inmunotinción como describe (Bales, K.R., *et al.*, *Nature Genet.* (1997) 17:263-264). Se incubó tejido de todos los grupos de animales con IgG anti-ratón marcado con fluoresceína (Vector, Inc.) y se examinó a continuación al microscopio de fluorescencia. No se observó ninguna coloración específica de depósitos de A β en ninguno de los grupos. En cambio, cuando se aplicó Mab 266 a las secciones antes de la incubación de las secciones con IgG anti-ratón, se detectaron claramente depósitos de A β .

Ejemplo 11

Efecto de la administración de anticuerpo 266 en el conocimiento en ratones PDAPP hemigigóticos, transgénicos de 24 meses

Se utilizaron 16 ratones transgénicos hemigigóticos (APP^{V717F}). Los ratones tenían aproximadamente 24 meses al comienzo del estudio. Todas las inyecciones fueron por vía intraperitoneal (i.p.). La mitad de los ratones recibieron inyecciones semanalmente de solución salina tamponada con fosfato (PBS, "Control") y la otra mitad recibió 500 microgramos de anticuerpo 266 de ratón disuelto en PBS. Las inyecciones se administraron durante un periodo de siete semanas (42 días) para un total de seis inyecciones. Tres días después de la última inyección, se evaluó el comportamiento de los animales utilizando una tarea de reconocimiento de objetos, esencialmente como se describe en J.-C. Dodart, *et al.*, *Behavioral Neuroscience*, 113 (5) 982-990 (1999). Se calculó el índice de reconocimiento ($T_B \times 100 / (T_B + T_A)$). Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 1.

TABLA 1 Estadísticas descriptivas del índice de reconocimiento

Índice de reconocimiento (minutos)				
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control (PBS)	8	71,2**	8,80	3,11
Anticuerpo 266	8	54,35	7,43	2,62
**p=0,0010				

La administración de 500 microgramos de anticuerpo 266 a la semana a ratones transgénicos, hemigigóticos, de 24 meses se relacionó con un cambio significativo en el comportamiento. Los ratones transgénicos tratados con anticuerpo presentaban índices de reconocimiento que eran similares a los animales de control salvajes [J.-C. Dodart, *et al.*]. La diferencia en el índice de reconocimiento era estadísticamente significativa en el nivel de probabilidad de 0,001. El aumento del índice de reconocimiento es una indicación de que el tratamiento con un anticuerpo que se une al péptido amiloide beta en la zona de los aminoácidos 13 a 28 invertirá las alteraciones de comportamiento que se habían documentado en este modelo de enfermedad de Alzheimer de ratón. Por consiguiente, la administración de anticuerpos que se unen al péptido amiloide beta en la zona de los aminoácidos 13 a 28 tratará enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down e interrumpirá la disminución cognitiva relacionada normalmente con la evolución de la enfermedad.

Se cuantificó la carga amiloide (% de área cubierta por material inmunorreactivo después de la tinción con anticuerpos anti-A β 3D6 ó 21F12) en la corteza cerebral cubriendo inmediatamente el hipocampo incluyendo las áreas de la corteza cerebral cingulada y parietal de los cerebros de los animales de 24 meses tratados con anticuerpo 266 de ratón durante siete semanas, tal como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la tabla siguiente. Las diferencias entre los grupos de tratamiento no son estadísticamente significativas.

TABLA 2. Carga de placa amiloide en ratones APP^{V717F/+} después del tratamiento con anticuerpo anti-A β 266 de ratón

Carga de placa (%)					
	N	Utilizando 3D6		Utilizando 21F12	
		Media	Error estándar	Media	Error estándar
Control (PBS)	7	44,3	5,93	0,77	0,14
Anticuerpo 266	8	38,0	2,96	0,93	0,11

Para estos animales muy viejos, el tratamiento con anticuerpo 266 de ratón no produjo una carga amiloide significativamente diferente comparada con el grupo tratado con PBS, medido utilizando bien 3D6 o utilizando 21F12. Además, la carga de A β fue sustancialmente mayor y aumentó significativamente en comparación con la carga amiloide en los animales más jóvenes (véase a continuación) que no pudieron discriminar un objeto nuevo de otro familiar en la tarea de reconocimiento de objetos. De la manera más sorprendente, estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-A β pueden invertir las deficiencias cognitivas sin necesidad de reducir la carga amiloide *per se*.

Después de 7 semanas de tratamiento, el índice de reconocimiento del grupo tratado con m266 no fue significativamente diferente del que sería de esperar de una cohorte salvaje de ratones de 24 meses. Esto indica una inversión completa de la disminución cognitiva en estos animales transgénicos.

Ejemplo 12

Efecto de la administración de anticuerpo 266 en el conocimiento en ratones PDAPP hemicigóticos, transgénicos jóvenes

Se utilizaron cincuenta y cuatro (54) ratones (APP^{V717F}) homocigóticos, transgénicos. Veintitrés (23) ratones tenían aproximadamente dos meses al principio del estudio. Los ratones restantes tenían aproximadamente cuatro meses al principio del estudio. La duración del tratamiento fue de cinco meses. De este modo, al final de estudio, los ratones tenían aproximadamente siete (7) meses o aproximadamente nueve (9) meses.

Todas la inyecciones fueron intraperitoneales (i.p.). Cada ratón en los grupos de control con "PBS" recibió una inyección a la semana de solución salina tamponada con fosfato (PBS; 200 β L). Cada ratón de los grupos de control con "IgG" recibió una inyección a la semana de isotipo de control IgG¹ (100 μ g/ratón/semana). Cada ratón de los grupos de "dosis altas" recibió una inyección a la semana de 500 microgramos de anticuerpo 266 disuelto en PBS ("HD"). Cada ratón del grupo de "dosis bajas" recibió una inyección a la semana de 100 microgramos de anticuerpo 266 disuelto en PBS ("LD"). Tres días después de la última inyección, se evaluó el comportamiento de los animales utilizando una tarea de reconocimiento de objetos, tal como se describió en el Ejemplo 10 anteriormente, y se calculó el índice de discriminación como diferencia entre el tiempo transcurrido en un nuevo objeto y el tiempo transcurrido en un objeto familiar. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3. Los datos están agrupados por edad de los ratones al final del estudio.

TABLA 3 Estadísticas descriptivas del índice de discriminación

Índice de discriminación (minutos)				
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
De 7 meses				
PBS	7	2,12	4,22	1,59
IgG	8	0,81	3,64	1,29
HD	8	10,04*	6,52	2,30
De 9 meses				
PBS	7	1,87	3,54	1,34
IgG	8	0,96	3,51	1,24
LD	8	10,75*	6,44	2,28
HD	8	12,06***	7,82	2,76

*p<0,05 ***p<0,0001

Considerados en conjunto, estos datos apoyan la conclusión de que la administración de anticuerpo 266, anticuerpo dirigido contra el dominio central de A β , atenúa la deposición de la placa en ratones APP^{V717F} transgénicos de 7 a 9 meses, así como invierte las alteraciones de comportamiento caracterizadas anteriormente. El tratamiento de pacientes con un anticuerpo dirigido contra el dominio central del péptido A β inhibirá o evitará la disminución cognitiva relacionada normalmente con la evolución de la enfermedad y la invertirá.

El índice de discriminación para los animales tratados no fue significativamente diferente del que sería de esperar en ratones salvajes de la misma edad. De este modo, solo en los animales más viejos (Ejemplo 11), el tratamiento con m266 invirtió completamente la disminución cognitiva en estos animales transgénicos más jóvenes.

Ejemplo 13

5 Síntesis de anticuerpo 266 humanizado

Células y anticuerpos. Se obtuvo la línea celular Sp2/0 de mieloma de ratón en ATCC (Manassas, VA) y se mantuvo en medio DME conteniendo FBS al 10% (n° de cat. SH32661.03, HyClone, Logan, UT) en un incubador con CO₂ a 37°C. Se cultivaron en primer lugar células de hibridoma 266 de ratón en medio RPMI-1640 conteniendo FBS al 10% (HyClone), HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, 25 µg/ml de gentamicina y a continuación se expandió en medio exento de suero (Hibridoma SFM, n° de cat. 12045076, Life Technologies, Rockville, MD) conteniendo 2% bajo en Ig FBS (n° de cat. 30151.03, HyClone) hasta un volumen de 2,5 litros en botellas para rodillo. Se purificó el anticuerpo 266 (Mu266) monoclonal de ratón en el cultivo sobrenadante por cromatografía de afinidad utilizando una columna Sepharose con proteína G. Se preparó Mu266 biotinilado utilizando EZ-Link Sulfa-NHS-LC-LC-Biotina (n° de cat. 21338ZZ, Pierce, Rockford, IL).

Clonación de los ADNc con zona variable. Se extrajo ARN completo de aproximadamente 10⁷ células de hibridoma utilizando reactivo TRIzol (Life Technologies) y se aisló poli(A)+ARN con el sistema de aislamiento de ARNm PolyATract (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del proveedor. Se sintetizó ADNc de doble cadena utilizando el kit de amplificación de ADNc SMARTTM RACE (Clontech, Palo Alto, CA) siguiendo las instrucciones del suministrador. Los ADNc con zona variable para la luz y las cadenas pesadas se amplificaron por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores 3' que hibridan respectivamente a las zonas constantes de las cadenas kappa y gamma de ratón y al cebador 5' universal proporcionado en el kit de amplificación de ADNc SMARTTMRACE. Para la PCR de VL, el cebador 3' tiene la secuencia:

5' -TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC - 3'

(SEC ID N.º:13)

con los residuos 17 a 46 que hibridan la región Ck de ratón. Para la PCR de VH, los cebadores 3' presentan las secuencia degeneradas:

5' -TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTTGGC - 3'

A G T

T

25 (SEC ID N.º:14)

con los residuos 17 a 50 que hibridan la cadena CH1 gamma de ratón. Se subclonaron los ADNc de VL y VH en el vector pCR4Truncado-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la determinación de la secuencia. Se realizó el secuenciado del ADN mediante reacciones de secuenciado en ciclo de PCR con terminaciones fluorescentes de cadena dideoxi (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Se analizaron las reacciones de secuenciado en un secuenciador de ADN modelo 377 (Applied Biosystems).

Construcción de zonas variables de 266 humanizados (*Hu266*). Se realizó la humanización de las zonas V del anticuerpo de ratón tal como esboza Queen *et al.* [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1988)]. Se seleccionó la estructura de la zona V humana utilizada como aceptor para las CDR de Mu266 basándose en la homología de secuencia. Se utilizaron los programas de ordenador ABMOD y ENCAD [Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168:595-620 (1983)] para construir un modelo molecular de las zonas variables. Se sustituyeron los aminoácidos en las zonas V humanizados que se preveían que se habían puesto en contacto con las CDR por los correspondientes restos de Mu266. Esto se realizó en los residuos 46, 47, 49 y 98 en la cadena pesada y en el residuo en la cadena ligera. Se cambiaron los aminoácidos en la zona V humanizada que se observó que eran raros en el mismo subgrupo de la zona V por los aminoácidos de consenso para eliminar la inmunogenicidad potencial. Esto se realizó en los residuos 42 y 44 en la cadena ligera.

Se construyeron y ampliaron los genes de la zona variable de la cadena ligera y pesada utilizando ocho oligonucleótidos sintéticos solapantes ordenados en longitud desde aproximadamente 65 a 80 bases [He, X.Y., *et al.*, *J. Immunol.* 160:1029-1035 (1998)]. Se hibridaron los oligonucleótidos por parejas y se ampliaron con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I, dando cuatro fragmentos de doble cadena. Se desnaturalizaron los fragmentos resultantes, se hibridaron por parejas y se ampliaron con Klenow, dando dos fragmentos. Se desnaturalizaron estos fragmentos, se hibridaron por parejas y se ampliaron otra vez más, dando un gen completo. Se amplió el producto resultante por PCR utilizando el sistema PCR Expand High Fidelity (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Se purificaron en gel los fragmentos ampliados por PCR y se clonaron en el vector pCR4Truncado-TOPO. Después de la confirmación de la secuencia, se digirieron los genes VL y VH con *MXI*uI y *Xba*I, se purificaron con gel y se subclonaron respectivamente en vectores para expresión de las cadenas ligera y pesada para preparar pVκ-Hu266 y

pVg1-Hu266 (véase las Figuras 6 y 7, respectivamente, en la presente memoria) [Co, M.S., *et al.*, *J. Immunol.* 148:1149-1154 (1992)]. El anticuerpo 266 maduro humanizado expresado en estos plásmidos tiene la cadena ligera de la SEC. ID N.º: 11 y la cadena pesada de la SEC. ID N.º: 12.

Transfección estable. Se realizó la transfección estable en la línea celular Sp2/0 del mieloma de ratón por electroporación utilizando un aparato pulsador de genes (BioRad, Hércules, CA) a 360 V y 25 μ F tal como el descrito (Co *et al.*, 1992). Antes de la transfección, se alinearon los ADN de los plásmidos pVk-Hu266 y pVg1-Hu266 utilizando Fspl. Se transfectaron aproximadamente 10^7 células Sp2/0 con 20 μ g de pVk-Hu266 y 40 μ g de pVg1-Hu266. Las células transfectadas se pusieron en suspensión en medio DME conteniendo FBS al 10% y se colocaron en varias placas de 96 pocillos. Después de 48 h, se aplicó los medios de selección (medio DME conteniendo FBS al 10%, complemento del medio HT, 0,3 mg/ml de xantina y 1 μ g/ml de ácido micofenólico). Aproximadamente 10 días después del inicio de la selección, se analizó la producción de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes del cultivo como se muestra a continuación. Se expandieron los clones con alto rendimiento en medio DME conteniendo FBS al 10% y se analizó la expresión del anticuerpo posteriormente. Se adaptaron a continuación los clones seleccionados al cultivo en hibridoma SFM.

Medición de la expresión del anticuerpo por ELISA. Se recubrieron los pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos (placa Nunc-Immuno, N° de cat. 439454, NalgeNunc, Naperville, IL) con 100 μ l de 1 μ g/ml de IgG anti-humana de cabra, fragmento específico de Fcy, anticuerpos policlonales (N° de cat. 109-005-098, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) en tampón de carbonato-bicarbonato sódico (pH 9,4) toda la noche a 4°C. Después de lavar con tampón de lavado (PBS conteniendo Tween 20 al 0,1%), se bloquearon los pocillos con 400 μ l de tampón de bloqueo Superblock (N° de cat. 37535, Pierce) durante 30 min y a continuación se lavó con tampón de lavado. Las muestras conteniendo Hu266 se diluyeron de forma apropiada en tampón ELISA (PBS conteniendo 1% de BSA y 0,1% de Tween 20), y se aplicaron a placas ELISA (100 μ l por pocillo). Como patrón, se utilizó anticuerpo HuM195 monoclonal de IgG1 anti-CD33 humanizado (Co, *et al.*, 1992, anteriormente). Se incubó la placa ELISA durante 2 h a temperatura ambiente y se lavaron los pocillos con tampón de lavado. A continuación se aplicó a cada pocillo 100 μ l de anticuerpos policlonales kappa anti-humanos de cabra conjugados con HRP diluidos 1/1.000 (N° de cat. 1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) en tampón ELISA. Después de incubación durante 1 h a temperatura ambiente y lavado con tampón de lavado, se añadió a cada pocillo 100 μ l de sustrato ABTS (n° de cat. 507602 y n° 506502, Kirkegaard y Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se interrumpió el desarrollo de color añadiendo 100 μ l de ácido oxálico al 2% por pocillo. Se leyó la absorbancia a 415 nm utilizando un lector de microplacas OPTImax (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Purificación de Hu266. Se adaptó al crecimiento en hibridoma SFM uno de los transfectantes estables Sp2/0 (clon 1D9) que expresan mucho Hu266 y se expandió hasta 2 litros en botellas giratorias. Se recogió el sobrenadante del cultivo agotado cuando la viabilidad de las células alcanzó el 10% o por debajo y se cargó en una columna Sepharose con proteína A. Se lavó la columna con PBS antes de diluir el anticuerpo con glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5) y NaCl 0,1 M. Se dializó la proteína eluida frente a 3 cambios de 2 litros de PBS y se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m antes del almacenamiento a 4°C. Se determinó la concentración de anticuerpo midiendo la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml = 1,4 A_{280}). Se realizó la SDS-PAGE en tampón Tris-glicina según los procedimientos normalizados en un gel con gradiente 4-20% (n° de cat. EC6025, Novex, San Diego, CA). Se redujo el anticuerpo 266 humanizado purificado y se pasó en gel de SDS-PAGE. El anticuerpo completo presenta dos bandas de pesos moleculares aproximados de 25 kDa y 50 kDa. Estos resultados son acordes con los pesos moleculares de la cadena ligera y de la cadena pesada o del fragmento de la cadena pesada calculado a partir de sus composiciones de aminoácidos.

Ejemplo 14

Propiedades de la unión *in vitro* del anticuerpo 266 humanizado

Se comparó la eficacia de la unión del anticuerpo 266 humanizado, sintetizado y purificado como se describió anteriormente, con el anticuerpo 266 de ratón utilizando anticuerpo 266 de ratón biotinilado en un ELISA comparativo. Se recubrieron pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos (placa Nunc-Immuno, n° de cat. 439454, NalgeNunc) con 100 μ l de péptido β -amiloide (1a 42) conjugado con BSA en tampón de carbonato/bicarbonato sódico 0,2 M (pH 9,4) (10 μ g/mL) toda la noche a 4°C. Se preparó el conjugado A β ₁₋₄₂-BSA disolviendo 7,5 mg de A β ₁₋₄₂-Cys₄₃ (A β ₁₋₄₂ con cisteína C-terminal AnaSpec) en 500 μ l de sulfóxido de dimetilo e inmediatamente a continuación añadiendo 1.500 μ l de agua destilada. Se disolvió dos (2) miligramos de albumina de suero bovino activada con maleimida (Pierce) en 200 μ l de agua destilada. Se combinaron las dos soluciones, se mezclaron intensamente y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante dos (2) horas. Se utilizó la cromatografía en columna de gel para separar el péptido sin reaccionar del conjugado A β ₁₋₄₂-Cys-BSA.

Después de lavar los pocillos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) conteniendo Tween 20 al 0,1% (tampón de lavado) utilizando un lavador de placas ELISA, se bloquearon los pocillos añadiendo 300 μ l de reactivo SuperBlock (Pierce) por pocillo. Después de 30 minutos de bloqueo, se lavaron los pocillos con tampón de lavado y se eliminó el líquido en exceso.

Se añadió por triplicado una mezcla de Mu266 biotinilado (0,3 μ g/ml de concentración final) y anticuerpo competidor (Mu266 ó Hu266; comenzando por la concentración final de 750 μ g/ml y diluciones en serie 3 veces) en tampón ELISA

en un volumen final de 100 μ l por pocillo. Como control sin competidor, se añadió 100 μ l de 0,3 μ g/ml de Mu266 biotinilado. Como control de fondo, se añadió 100 μ l de tampón ELISA. La placa ELISA se incubó a temperatura ambiente durante 90 min. Después de lavar los pocillos con tampón de lavado, se añadió a cada pocillo 100 μ l de 1 μ g/ml de estreptavidina conjugada con HRP (n° de cat 21124, Pierce). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 min y se lavó con tampón de lavado. Durante el desarrollo de color, se añadió 100 μ l/pocillo de sustrato de ABTS peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories). Se interrumpió el desarrollo de color añadiendo 100 μ l/pocillo de ácido oxálico al 2%. Se leyó la absorbancia a 415 nm. Se representaron las absorbancias frente a log de la concentración del competidor, se ajustaron las curvas a los puntos de datos (utilizando Prism) y se determinó el IC50 para cada anticuerpo utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

La media IC50 para 266 de ratón fue 4,7 μ g/ml (tres experimentos independientes, desviación estándar = 1,3 μ g/ml) y para 266 humanizado fue 7,5 μ g/ml (tres experimentos independientes, desviación estándar = 1,1 μ g/ml). Se realizó una segunda serie de tres experimentos, esencialmente como se describió anteriormente y se determinó el IC50 medio para 266 de ratón que fue de 3,87 μ g/ml (SD=0,12 μ g/ml) y para 266 humano, se determinó el IC50 que fue 4,0 μ g/ml (SD=0,5 μ g/ml). Basándose en estos resultados, se saca la conclusión de que el 266 humanizado presenta propiedades de unión que son muy similares a las del anticuerpo 266 de ratón. Por consiguiente, es de esperar que el 266 humanizado presente actividades *in vitro* e *in vivo* muy similares comparadas con el 266 de ratón y presenten en el hombre los mismos efectos demostrados con el 266 de ratón en ratones.

Ejemplo 15

Propiedades de unión *in vitro* de anticuerpos 266 y 4G8 de ratón

Se determinó la afinidad del anticuerpo ($KD = Kd/Ka$) utilizando un biodetector 2000 de BIAcore y se analizaron los datos con el programa informático BIAevaluation (v. 3.1). Se acopló un anticuerpo de captura (anticuerpo de conejo) mediante grupos amina libres a grupos carbonilo en la celda de flujo 2 de un chip del biodetector (CM5) utilizando N-etil-N-dimetilaminopropil carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS). Se acopló IgG de conejo no específica a la celda de flujo 1 como control de fondo. Se capturaron anticuerpos monoclonales para dar 300 unidades de resonancia (RU). Se circuló a continuación amiloide-beta 1-40 ó 1-42 (Biosource International, Inc.) sobre el chip y concentraciones decrecientes (1000 a 0,1 veces KD). Para regenerar el chip, se eluyó anticuerpo anti-A β ligado desde el chip utilizando un lavado con glicina-HCl (pH 2). Una inyección de control no conteniendo amiloide-beta sirvió como control para la sustracción de control. Se analizaron los sensorgramas que demuestran las fases de asociación y disociación para determinar Kd y Ka. Utilizando este método, se observó que la afinidad del anticuerpo 266 de ratón tanto para A β ₁₋₄₀ como para A β ₁₋₄₂ era de 4 pM. La afinidad de 4G8 para A β ₁₋₄₀ fue de 23 nM y para A β ₁₋₄₂ fue de 24 nM. A pesar de la diferencia de 6000 veces en las afinidades para A β , tanto 266 como 4G8, que se une a los epítomos entre los aminoácidos 13 y 28 de A β , secuestran de manera eficaz A β en el CSF humano. Por consiguiente, la situación del epítipo es de suma importancia, más que la afinidad de unión, para determinar la capacidad de un anticuerpo para secuestrar A β y para proporcionar las ventajas beneficiosas y sorprendentes de la presente invención.

Ejemplo 16

Cartógrafa del epítipo del anticuerpo 266 de ratón utilizando la metodología Biacore y péptidos solubles

BIAcore es un sistema biodetector automatizado para medir las interacciones moleculares [Karlsson R., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 145:229-240 (1991)]. La ventaja del BIAcore respecto a otros análisis de unión es que la unión del antígeno se puede medir sin tener que marcar o inmovilizar el antígeno (es decir, el antígeno mantiene una conformación más natural). Se utilizó la metodología BIAcore para evaluar la unión de varios fragmentos de péptido beta- amiloide en el anticuerpo 266 de ratón, esencialmente como se describió anteriormente en el Ejemplo 12, excepto que todas las diluciones se prepararon con solución salina tamponada con HEPES conteniendo Tween 20, se inyectaron una variedad de fragmentos A β (BioSource International), y se inyectó una sola concentración de cada fragmento (440 nM).

Los fragmentos de amiloide beta 1 a 28, 12 a 28, 17 a 28 y 16 a 25 se unieron al anticuerpo 266 de ratón, mientras que los fragmentos de A β 1 a 20, 10 a 20 y 22 a 35 no se unieron. Los fragmentos 1 a 20, 10 a 20 y 22 a 35 se unieron a otros Mab con especificidad de epítipo conocida para estas zonas de A β . Utilizando esta metodología, el epítipo de unión para el anticuerpo 266 de ratón parece estar entre los aminoácidos 17 y 25 de A β . Dado que la unión tiene lugar normalmente con por lo menos 3 restos del presente epítipo, se podría deducir además que el epítipo está contenido en los residuos 19 a 23.

Ejemplo 17

Propiedades de la unión *in vitro* de anticuerpo 266 humanizado

Se determinó esencialmente tal como se describió anteriormente en el Ejemplo 15 la afinidad ($KD = Kd/Ka$) del anticuerpo 266 humanizado, sintetizado y purificado como se describió anteriormente. Utilizando este procedimiento, se observó que la afinidad del 266 humanizado para A β ₁₋₄₂ era de 4 pM.

y una secuencia con estructura de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina humana; en la que el anticuerpo o fragmento une específicamente un epítipo que contiene las posiciones 13 a 28 de Aß.

2. Anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que la cadena CDR1 es:

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

5 (SEC. ID N.º: 1) y

cadena pesada CDR2:

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

(SEC. ID N.º: 5)

3. Anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 1, que comprende una zona variable de cadena ligera humanizada que comprende la siguiente secuencia:

1 5 10 15
Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa
20 25 30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa
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 Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
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 Xaa Gly Val
95 100 105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa
110
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg

(SEC. ID N.º: 7)

en la que:

Xaa en la posición 2 es Val ó Ile;

Xaa en la posición 7 es Ser ó Thr;

Xaa en la posición 14 es Thr ó Ser;

Xaa en la posición 15 es Leu ó Pro;

Xaa en la posición 30 es Ile ó Val;

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

Xaa en la posición 88 es Val ó Leu;

Xaa en la posición 105 es Gln ó Gly;

Xaa en la posición 108 es Lys ó Arg; y

Xaa en la posición 109 es Val ó Leu.

y una zona variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia:

```

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

           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 Asn Ser Thr Tyr Tyr

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

           80           85           90
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

           110
Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser

```

5 (SEC. ID N.º: 8)

en la que:

Xaa en la posición 1 es Glu ó Gln;

Xaa en la posición 7 es Ser ó Leu;

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

10 Xaa en la posición 63 es Thr ó Ser;

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

Xaa en la posición 76 es Lys ó Arg;

Xaa en la posición 89 es Glu ó Asp;

Xaa en la posición 107 es Leu ó Thr.

15 4. Anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 1, que presenta una zona variable de cadena ligera de la secuencia determinada por la SEC ID N.º: 9 y una zona variable de cadena pesada determinada por la SEC ID N.º: 10.

5. Anticuerpo humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 4, que presenta una cadena ligera de la secuencia determinada por la SEC ID N.º: 11 y una cadena pesada de la secuencia determinada por la SEC ID N.º: 12.

20 6. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 5.

7. Anticuerpo humanizado o fragmento de la reivindicación 1 que es un isótopo de la inmunoglobulina IgG₁.

8. Anticuerpo humanizado o fragmento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se produce en una célula huésped seleccionada de entre el grupo que consiste en una célula de mieloma, una célula de ovario de hámster chino, una célula de ovario de hámster sirio, y una célula de riñón embrionario humano.

25 9. Un ácido polinucleico que comprende una secuencia codificadora para la cadena ligera o la cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento de la reivindicación 1.

10. Ácido polinucleico de la reivindicación 9, que comprende una secuencia codificadora para la zona variable de la cadena ligera dada por la SEC ID N.º: 7 o la SEC ID N.º: 9.

11. Ácido polinucleico de la reivindicación 9, que comprende una secuencia codificadora para la zona variable de la cadena pesada dada por la SEC ID N.º: 8 o la SEC ID N.º: 10.
12. Ácido polinucleico de la reivindicación 9, que comprende una secuencia codificadora para la cadena ligera dada por la SEC ID N.º: 11.
- 5 13. Ácido polinucleico la reivindicación 9, que comprende una secuencia codificadora para la cadena pesada dada por la SEC ID N.º: 12.
14. Ácido polinucleico que comprende una secuencia codificadora para la cadena ligera o la cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento de la reivindicación 5.
- 10 15. Ácido polinucleico, que cuando se expresa en una célula huésped adecuada, da el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1.
16. Ácido polinucleico, que cuando se expresa en una célula huésped adecuada, da el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 5.
17. Un vector de expresión para expresar el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican dicho anticuerpo o fragmento.
- 15 18. Una célula transfectada con el vector de expresión de la reivindicación 17.
19. Célula transfectada con dos vectores de expresión de la reivindicación 17, en la que un primer vector comprende la secuencia de polinucleótido que codifica para la cadena ligera y un segundo vector comprende la secuencia que codifica para la cadena pesada.
- 20 20. Un vector de expresión para expresar el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 5, que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican dicho anticuerpo o fragmento.
21. Una célula transfectada con el vector de expresión de la reivindicación 20.
22. Célula transfectada con dos vectores de expresión de la reivindicación 20, en la que un primer vector comprende la secuencia de polinucleótido que codifica para la cadena ligera y un segundo vector comprende la secuencia que codifica para la cadena pesada.
- 25 23. Célula que puede expresar el anticuerpo humanizado o fragmento de la misma de la reivindicación 1 o la reivindicación 5.
24. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 25. Uso del anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, para la fabricación de un medicamento, para el tratamiento clínico o preclínico de la enfermedad de Alzheimer, del síndrome de Down o de la angiopatía amiloide cerebral clínica o preclínica.
26. Uso de un anticuerpo humanizado o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la prevención o la reducción cognitiva inversa en la enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica, síndrome de Down o la angiopatía amiloide cerebral clínica o preclínica.
- 35 27. Uso del anticuerpo humanizado o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

1

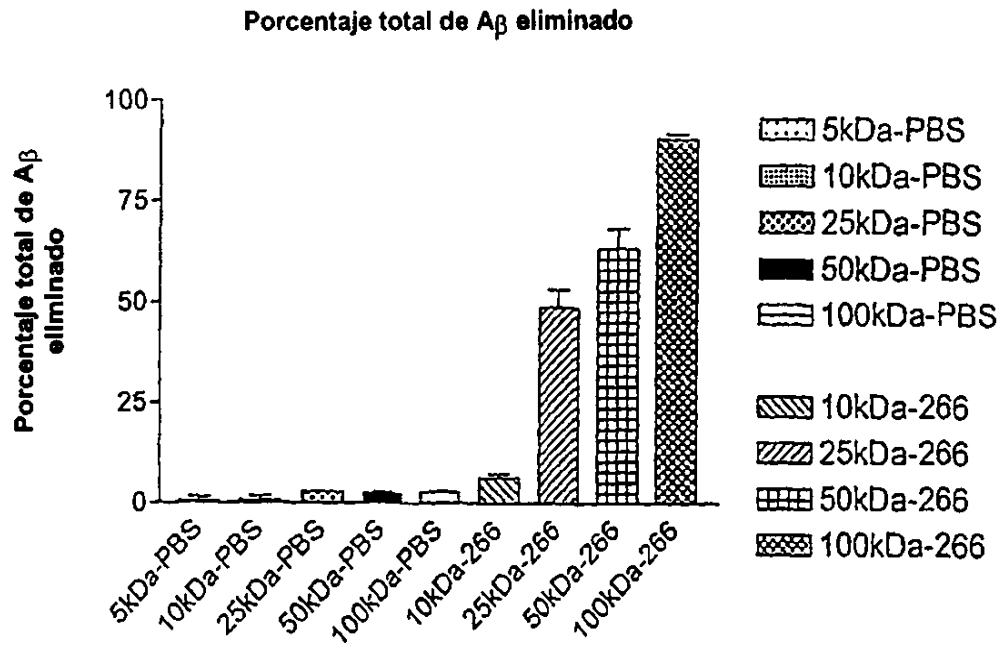


FIGURA 1

**Concentración de $A\beta$ en el plasma después de la
inyección intravenosa de 266 en ratones APP^{V717F}**

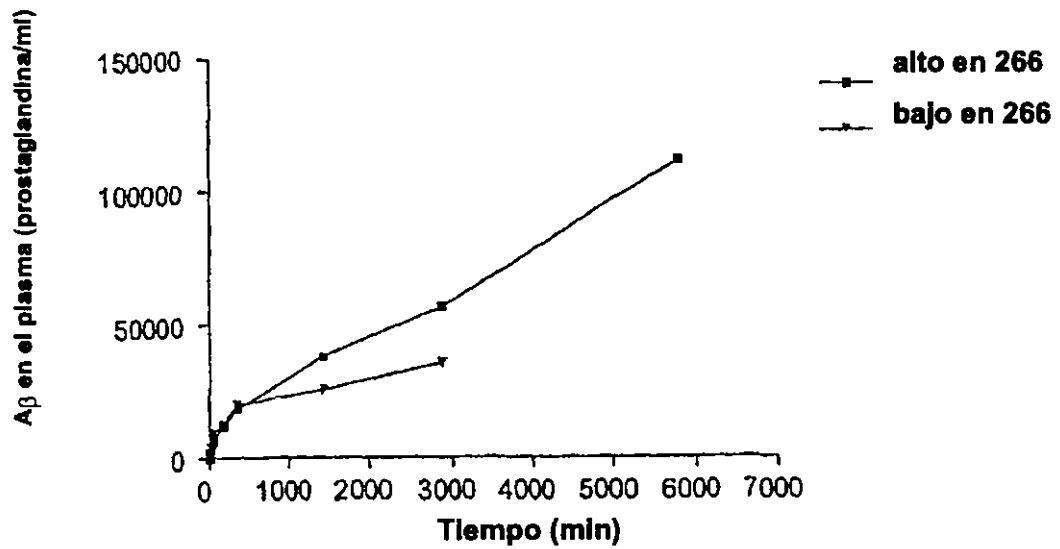


FIGURA 2

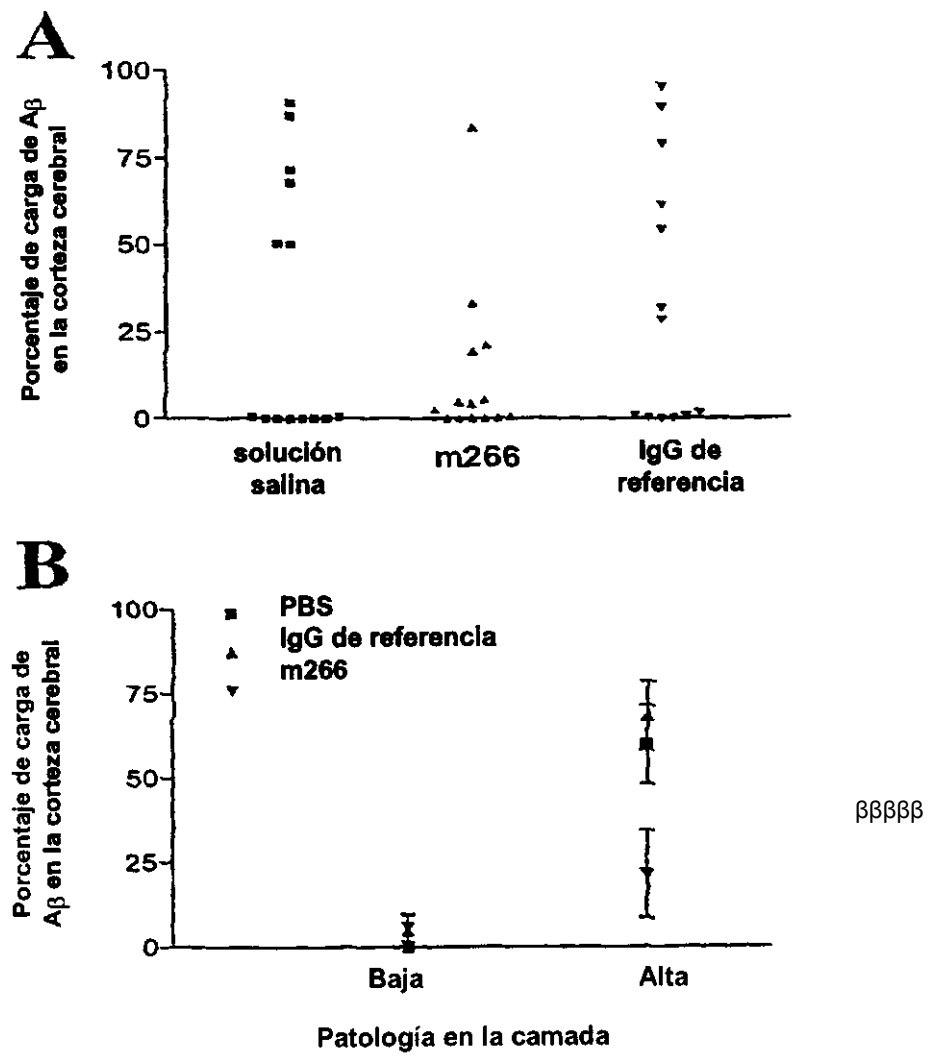


FIGURA 3

Figura 4. Secuencias de polinucleótidos de pVh-Hu266 para expresar la cadena ligera de 266 humanizado y códigos de un solo aminoácido para la cadena ligera de 266 humanizada expresada

```

619 ACGCGTCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTCCAGGTGTGATGTTGTGATG
      M K L P V R L L V L M F W I P A S R C Q V V M

699 ACCCAGAGCCCACTCTCCCTGCCTGTCAACCTTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTTATATA
      T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L I Y

779 TAGTGATGGAAACGCCTATTTACATTGGTTCTTGACAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTCTGATCTACAAAGTTTCCA
      S D G N A Y L H W F L Q K P G Q S P R L L I Y K V S N

859 ACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG
      R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E

939 GCCGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGTTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTCAAGGCACCAAGGTGGAAT
      A E D V G V Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I

1019 CAAACGTGAGTAGAATTTAATCTAGAAATTCTAACTCTGAGGGGGTCCGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAGCATT
      K R

1099 GAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATTTAGAACTTT
      K R

1179 ATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATT
      K R

1259 ATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAAACAACAACCCCAAGGGCAGAA
      K R

1339 CTTTGTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCTCCTCAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
      T V A A P S V F I F P P S

1419 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
      D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W

1499 TGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
      K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L

1579 CCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAACAAGTCTACGCTCGGAAGTCACCCATCAGGGCC
      S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L

1659 TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCCCCACCTGCTCCTCAGTTCCAGC
      S S P V T K S F N R G E C .

1739 CTGACCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTT
1819 CACCTCACCCCTCCTCCTCCTTGGCTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCAC
1899 CTGTGGTTTCTCTCTTCTCCTCATTTAATAATTATATCTGTGTTTACCAACTACTCAATTTCTTTATAAGGGACTAA
1979 ATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCTTCATTCTATTTTACCCCTATCATCCTCTGCAAGAC
2059 AGTCTCCTCCTCAAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCAGTCCCTCGGGCCATGGTAGGAGAGACTGCTTCTTGTGTTTCC
2139 CCTCCTCAGCAAGCCCTCATAGTCTTTTAAAGGGTGACAGGTCTTACAGTCATATATCTTTGATTCAATTCCTGAGA
2219 ATCAACCAAGCAAAATTTTCAAAGAAGAAACCTGCTATAAAGAGAATCATTTCATTGCAACATGATATAAAATAACAAC
2299 ACAATAAAGCAATTAAATAAACAACAATAGGGAAATGTTAAGTTCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGTCATG
2379 CTTATTTACATTTTAAACAGGTACTGAGGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATTGAGTACTTTCCACAACCTAATTT
2459 AATCCACACTATCTGTGAGATTAAAAACATTCATTAAATGTTGCAAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATATATTC

```

2539 TATAACTCAGCAATCCCACTTCTAGGATCC

La secuencia completa del gen de la cadena ligera de Hu266 está localizada entre los puntos MluI y BamHI en pVk-Hu266. El número de nucleótido indica su posición en pVk-Hu266. Los exones V_k y C_k se traducen por un código de una sola letra; el punto indica el codón de terminación de la traducción. La cadena pesada madura comienza en el ácido aspártico (D) con subrayado doble. Las secuencias del intrón están en cursiva.

Figura 5. Secuencias de polinucleótidos de pVg1-Hu266 para expresar la cadena pesada de 266 humanizado y códigos de un solo aminoácido para la cadena pesada de 266 humanizada expresada.

```

619 ACGCGTCCACCATGAATTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTAAAGGTGTCCTGTGTGAAGTGCAGCTG
    M N F G L S L I F L V L V L K G V L C E V Q L
699 GTGGAGTCTGGGGAGGTTTAGTGACAGCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTAGTAG
    V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S R
779 GTATTCATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAATTGGTCGCACAAATTAATAGTGTGTGTAATAGCA
    Y S M S W V R Q A P G K G L E L V A Q I N S V G N S
859 CCTACTATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAATGAAC
    T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N
939 TCCCTGAGGGCCCAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGCGGAGACTACTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTGACAGTCTC
    S L R A E D T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T L V T V S
1019 CTCAGGTGAGTCTCTCAAACTCTAGAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTA
    S
1099 AGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAAATGCCCATGAGCCAGACACTGGAAGCTGAACCTCGCGGACAGT
1179 TAAGAACCCAGGGGCTCTGGGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCCAACCCGGGTCAATGGCACCACTCTCTTGCAGCCT
    A
1259 CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGTGCTCTG
    S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
1339 GTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAGTCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGC
    V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A
1419 TGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA
    V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S L G T Q T Y
1499 TCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAACAAGAAAGTTGTGTGAGAGGCCAGCAAGGGAGGGAGGGTGC
    I C N V N H K P S N T K V D K K V
1579 TCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCTGGAACGATCCCGGCTATGACAGCCCACTCCAGGGCAGCAAGGCAGGGC
1659 CCGTCTGCTCTTCAACCGGAGGCTCTGCGCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCAGGCT
1739 CTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCCCTAAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAG
1819 CCATATCCGGGAGGACCTGCCCCCTGACCTAAGCCCCACCCCAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTC
1899 TCTCTCCAGATTCCAGTAATCTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAATCTGTGACAAAATCTCACACATGCCACCCG
    E P K S C D K T H T C P P
1979 TGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGACAGGTGCCCCAGAGTAGCTGCATCCAGGGACA
    C P
2059 GGGCCAGCCGGGTGCTGACAGCTCCACCTCCATCTCTCTGCTCAGCACTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTC
    A P E L L G G P S V F L
2139 TTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
    F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E
2219 AGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
    D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q
2299 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
    Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K
2379 GTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGCTGGGGTGGCAGGGCC
    V S N K A L P A P I E K T I S K A K
2459 ACATGGACAGAGCCGGCTCGGGCCACCTCTGCCCCGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGCAGGCC
    G Q P
2539 CGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCGCTGGTCAA
    R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K
2619 AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCG

```

G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P

2699 TGCTGGACTCGGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F

2779 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCG
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *

2859 ACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGTTCGACGAGGATGCTTGGCAGTACCCCTGTACATACTTCCCG
2939 GCGCCCCAGCATGGAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTCAGGC
3019 CGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGCTCCCACTGTCCCACTGGCCAGGCTGTGCAGGTGTGC
3099 CTGGGCCGCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCGGCAGGGTGGGGGATTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGC
3179 AGCACCTGCCCTGGGCTGGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCCCTGGGGACAGACACAGCCCCCTGCCCTCTGTAGGAGAC
3259 TGTCTGTCTGTGAGCGCCCTGTCTCTCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCCTAGTCCATGTGCGTAGGGACAGG
3339 CCCTCCCTCACCCATCTACCCCAACGGCACTAACCCCTGGCTGCCCTGCCAGCCTCGCACCCGCATGGGGACACAACCG
3419 ACTCCGGGGACATGCACTCTCGGGCCCTGTGGAGGGACTGGTGAGATGCCACACACACACTCAGCCAGACCCGTTCA
3499 ACAAACCCCGCACTGAGGTTGGCCGGCCACACGGCCACCACACACACACGTCACGCTCACAACGGAGCCTCACCAGG
3579 GCGAACTGCACAGCACCCAGACCAGAGCAAGGTCTCGCACACGTGAACACTCCTCGGACACAGGCCCCACAGGCCCA
3659 CGCGGCACCTCAAGGCCACAGGCCTCTCGGCAGCTTCTCCACATGCTGACCTGCTCAGACAAACCCAGCCCTCTCTCA
3739 CAAGGGTGCCCTGCGAGCCGCCACACACACAGGGGATCACACACCAAGTCACGTCCCTGGCCCTGGCCCACTTCCAG
3819 TGCCGCCCTTCCCTGCAGGATCC

La secuencia completa del gen de la cadena pesada de Hu266 está localizada entre los puntos MluI y BamHI en pVg1-Hu266. El número de nucleótido indica su posición en pVg1-Hu266. Los exones V_H y C_H se traducen por un código de una sola letra. El punto indica el codón de terminación de la traducción. La cadena pesada madura comienza en el ácido glutámico (E) con subrayado doble. Las secuencias del intrón están en cursiva.

Figura 6. Plásmido pVkJHu266

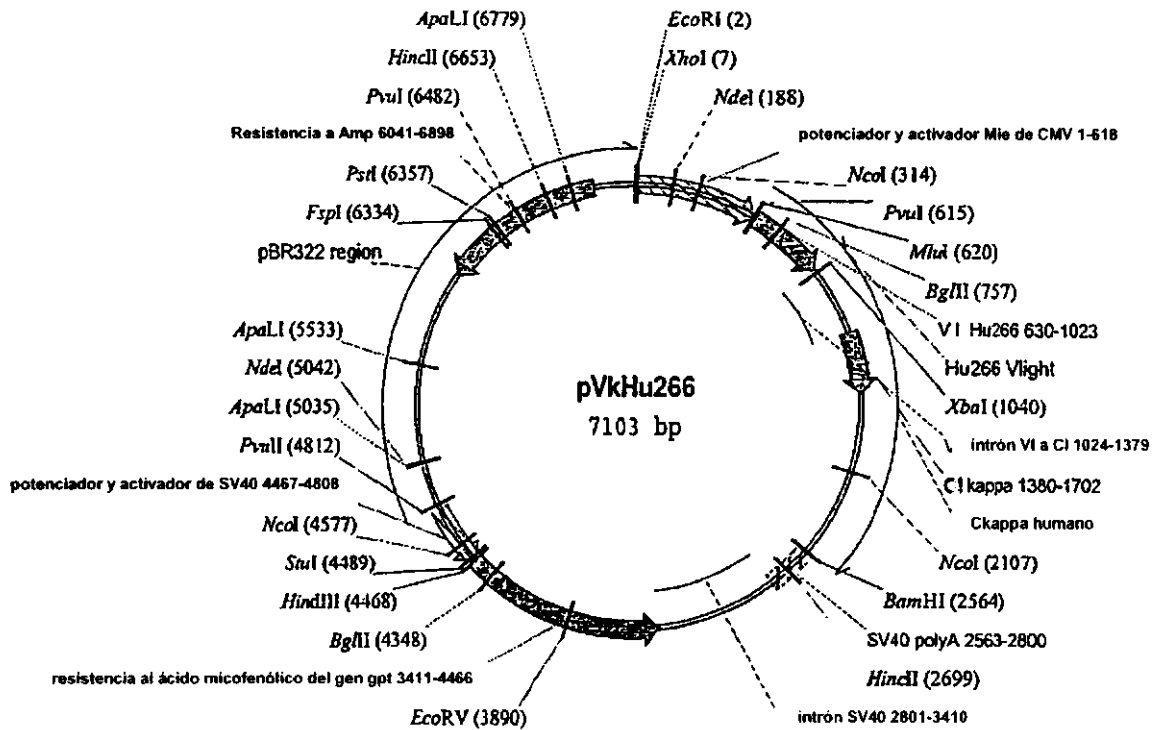


Figura 7. Plásmido pVg1-Hu266

