



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 006**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01) **A61K 39/42** (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01) **C12P 21/08** (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) **C12N 15/70** (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02728775 .4**

96 Fecha de presentación : **26.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1385545**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

54

Título: **Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido β -amiloide.**

30

Prioridad: **30.04.2001 US 287539 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73

Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285, US

72

Inventor/es: **Tsurushita, Naoya y**
Vasquez, Maximilano

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 318 006 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados que reconocen el péptido β -amiloide.

5 Esta solicitud reivindica la prioridad del documento US 60/287.539 presentado el 30 de abril de 2001.

La invención se refiere a anticuerpos humanizados útiles para tratar y prevenir enfermedades humanas asociadas con el β -amiloide ($A\beta$), tales como la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral. El anticuerpo monoclonal de ratón 3D6 ha sido ampliamente usado en procedimientos analíticos. Tras administrar el 3D6 a un grupo de ratones PDAPP transgénicos heterocigóticos de 11,5-12 meses de edad (APP^{V717F}) a una dosis intraperitoneal semanal de aproximadamente 10 mg/kg durante seis meses, se publicó que los ratones habían reducido significativamente la carga de la placa, aunque no se reveló la ubicación específica de la reducción. [Bard, F., *et al.*, *Nature Med.* 6: 916-919 (2000); WO 00/72876 y WO 00/72880, 7 de diciembre de 2000]. Se afirmó que el anticuerpo accedió al sistema nervioso central en suficientes cantidades como para “empapelar” las placas de β -amiloide. Finalmente, se afirmó que el 3D6 de ratón induce a la fagocitosis de la placa de amiloide en estudios *in vitro*.

En la publicación PCT W099/27944, publicada el 10 de junio de 1999, se describen procedimientos para administrar $A\beta$ 1-42 agregado para provocar una respuesta inmunológica y reducir los depósitos de amiloide. La descripción postula que el péptido $A\beta$ agregado de longitud completa sería un inmunógeno útil. La solicitud también indica que sería posible usar los anticuerpos que se unen al péptido $A\beta$ como agentes terapéuticos alternativos. Sin embargo, esto parece ser una especulación, pues los datos en los que se apoya esta teoría reflejan protocolos que implican una inmunización activa mediante el uso de, por ejemplo, $A\beta$ 1-42.

El documento WO 99/60024, publicado el 25 de noviembre de 1999, se dirige a procedimientos para la eliminación de amiloides mediante el uso de anticuerpos anti-amiloides. Sin embargo, se establece que el mecanismo utiliza la capacidad de los anticuerpos anti- $A\beta$ para unirse a depósitos de amiloide pre-formados (i.e., placas) y da como resultado el posterior aclaramiento microglial de las placas localizadas. Este mecanismo no fue probado *in vivo*. Esta publicación establece además que para que sean eficaces frente a las placas de $A\beta$, los anticuerpos anti- $A\beta$ deben ser administrados directamente en el cerebro, porque los anticuerpos no pueden atravesar la barrera hematoencefálica.

Queen *et al.* describen procedimientos para humanizar anticuerpos [p. ej., las patentes estadounidenses n.º 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370].

Las formas humanizadas de 3D6 son necesarias para su uso en seres humanos que padecen el síndrome de Down o la enfermedad de Alzheimer pre-clínica o clínica, o la angiopatía amiloide cerebral (AAC). Sin embargo, no se sabe si es posible humanizar los 3D6, tal que el anticuerpo humanizado conserve las propiedades de unión del anticuerpo de ratón.

40 Resumen de la invención

Esta invención proporciona formas humanizadas de 3D6. Estos anticuerpos humanizados tienen propiedades de unión (afinidad y localización de epítomos) que son aproximadamente las mismas que las del anticuerpo 3D6 de ratón. La invención incluye anticuerpos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. La invención incluye anticuerpos en los que las CDR sean las del anticuerpo monoclonal de ratón 3D6 (secuencias de SEC ID N.º 1 a SEC ID N.º 6), y anticuerpos que conservan aproximadamente las propiedades de unión del anticuerpo de ratón y tienen propiedades *in vitro* e *in vivo* funcionalmente equivalentes a las del anticuerpo de ratón. En otro aspecto, esta invención proporciona anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos, en los que las regiones variables tienen secuencias que comprenden la CDR del anticuerpo de ratón 3D6 y secuencias marco humanas específicas (secuencias de SEC ID N.º 7-SEC ID N.º 10), y son anticuerpos que conservan aproximadamente las propiedades de unión del anticuerpo de ratón y tienen propiedades *in vitro* e *in vivo* funcionalmente equivalentes a las del anticuerpo de ratón 3D6. 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.

También forman parte de la invención las secuencias de polinucleótidos que codifican los anticuerpos humanizados o los fragmentos de los mismos revelados anteriormente, vectores que comprenden las secuencias de polinucleótidos codificantes de los anticuerpos humanizados o los fragmentos de los mismos, células huésped transformadas con los vectores o que incorporan los polinucleótidos que expresan los anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos, formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos humanizados y de los fragmentos de los mismos revelados en la presente memoria, y procedimientos para elaborar y usar las mismas.

Tales anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos son útiles para, entre otras cosas, tratar y prevenir enfermedades y condiciones caracterizadas por las placas de $A\beta$ o la toxicidad del $A\beta$ en el cerebro, tales como la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral en seres humanos.

La invención también incluye el uso de un anticuerpo humanizado de la presente invención para la fabricación de un medicamento, incluyendo la expresión prolongada de las secuencias recombinantes del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo en tejidos humanos, para tratar, prevenir o invertir la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down o

la angiopatía amiloide cerebral, o para inhibir la formación de placas de amiloide o los efectos de las especies de A β solubles tóxicas en seres humanos.

5 Descripción detallada de la invención

Hemos descubierto que, sorprendentemente, los anticuerpos humanizados, en los que las CDR surgen del anticuerpo monoclonal de ratón 3D6, y las partes marco y otras partes de los anticuerpos surgen de una línea germinal humana, se unen a A β -40 y a A β 1-42 al menos con la afinidad con la que el 3D6 de ratón se une al A β . De este modo, tenemos bases razonables para creer que los anticuerpos humanizados de esta especificidad, modificados para reducir su inmunogenicidad mediante su conversión en una forma humanizada, ofrecen la oportunidad de tratar, tanto profiláctica como terapéuticamente, las condiciones en seres humanos que están asociadas con la formación de placas de beta-amiloide. Estas condiciones incluyen, como se indica anteriormente, la enfermedad de Alzheimer pre-clínica o clínica, el síndrome de Down y la angiopatía amiloide cerebral pre-clínica y clínica.

Como se usa en la presente memoria, la palabra “tratar” incluye el tratamiento terapéutico, con el conocimiento de que la condición que se va a tratar ya está presente, y la profilaxis, i.e., la prevención, o la mejoría, de la posible aparición en el futuro de una condición.

El término “anticuerpo” pretende significar un anticuerpo monoclonal *per se*, o un fragmento inmunológicamente eficaz del mismo, tal como un fragmento Fab, Fab’ o F(ab’)₂ del mismo. En algunos contextos, en la presente memoria, el término “fragmentos” se mencionará específicamente para enfatizar; no obstante, se entenderá que independientemente de si se especifica el término “fragmentos” o no, la palabra “anticuerpo” incluye tales fragmentos, así como las formas monocatenarias. Siempre y cuando la proteína conserve la capacidad para unirse específicamente a la diana deseada, ésta está incluida en el término “anticuerpo”. También se incluyen en la definición de “anticuerpo” las formas monocatenarias. Preferiblemente, pero no necesariamente, los anticuerpos útiles en la invención se producen recombinantemente. Los anticuerpos pueden estar o no glicosilados, aunque se prefieren los anticuerpos glicosilados. Los anticuerpos están entrecruzados adecuadamente mediante enlaces tipo disulfuro, como se sabe.

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

Las cadenas ligeras se clasifican en kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa o épsilon, y definen el isótopo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas pesadas y ligeras, las regiones variables y constantes están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo además la cadena pesada una región “D” de aproximadamente 3 o más aminoácidos.

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión de los anticuerpos. De este modo, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. Desde el terminal N al terminal C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de los aminoácidos a cada dominio se hace conforme a las convenciones conocidas [Rabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Institutos Nacionales de Sanidad, Bethesda, MD, 1987 y 1991; Chothia, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia, *et al.*, *Nature* 342: 878-883 (1989)].

“Anticuerpo humanizado” pretende significar un anticuerpo que está compuesto parcial o completamente por secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de anticuerpos humanos mediante la modificación de la secuencia de un anticuerpo que tenga regiones determinantes de la complementariedad no humanas (CDR). Una inmunoglobulina humanizada no engloba un anticuerpo quimérico que tenga una región variable de ratón y una región constante humana. Sin embargo, la región variable del anticuerpo e incluso la CDR se humanizan mediante técnicas que son por el momento conocidas por la técnica. Se sustituyen las regiones marco de las regiones variables por las correspondientes regiones marco humanas dejando la CDR no humana sustancialmente intacta. Como se menciona anteriormente, para su uso en los procedimientos de la invención basta con emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo los fragmentos que representan formas monocatenarias.

Los anticuerpos humanizados tienen al menos tres posibles ventajas frente a los anticuerpos no humanos y quiméricos para su uso en una terapia en seres humanos:

- 1) como la parte efectora es humana, puede interactuar mejor con el resto de las partes del sistema inmune humano (p. ej., destruir las células diana más eficazmente mediante una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

ES 2 318 006 T3

CDR2 de la cadena pesada:

5 1 5 10 15
Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val Lys Gly
 (SEC ID N.º5)

10 CDR3 de la cadena pesada:

15 1 5 10
Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr (SEC ID N.º6)

20 Una región variable de la cadena ligera preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en la que la región marco surge del segmento de Vk DPK19 y del segmento de J Jk4 de la línea germinal humana:

25 1 5 10 15
Xaa Val Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Xaa Leu Pro Val Thr Xaa Gly
 30 20 25 30
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 35 35 40 45
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 40
 45 50 55 60
Pro Xaa Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 80 85 90 95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 95 100 105 110
Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Xaa Glu ILe Lys
 100
Arg (SEC. ID N.º7)

50 en la que:

- el Xaa de la posición 1 es Asp o Tyr;
- el Xaa de la posición 7 es Ser o Thr;
- 55 el Xaa de la posición 10 es Ser o Thr;
- el Xaa de la posición 15 es Leu, Ile o Val;
- 60 el Xaa de la posición 50 es Arg o Lys;
- el Xaa de la posición 88 es Val o Leu; y
- 65 el Xaa de la posición 109 es Val o Leu.

Una región variable de la cadena pesada preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en la que la región marco surge del segmento de VH DP-45 y del segmento de J

ES 2 318 006 T3

JH4 de una línea germinal humana, con varias sustituciones de aminoácidos con respecto a los aminoácidos consenso del mismo subgrupo humano para reducir la posible inmunogenicidad:

```

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

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

10          35           40           45
  Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

           50           55           60
  Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val

15          65           70           75           8
  Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Xaa Leu Tyr

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

20          100          105          110
  Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

           115
25  Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
  
```

(SEC ID N.º8)

en la que:

- 30 el Xaa de la posición 3 es Gln, Lys o Arg;
- el Xaa de la posición 78 es Ser o Thr;
- el Xaa de la posición 87 es Arg o Lys;
- 35 el Xaa de la posición 88 es Ala, Ser o Thr; y
- el Xaa de la posición 114 es Leu, Thr, Ile o Val.

40 Una región variable de la cadena ligera particularmente preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en la que la región marco surge del segmento de Vk DPK19 y del segmento de J Jk4 de la línea germinal humana:

```

45           1           5           10           15
  Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

           20           25           30
  Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

50          35           40           45
  Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

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

55          65           70           75           80
  Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

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

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

65  Arg
  
```

(SEC ID N.º9)

ES 2 318 006 T3

Una región variable de la cadena pesada particularmente preferida de un anticuerpo humanizado de la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, en la que la región marco surge del segmento de VH DP-45 y del segmento de J JH4 de la línea germinal humana:

5

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

10

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

15

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

20

50 55 60
Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val

25

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

30

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

100 105 110
Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

115
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEC ID N.*10)

35

(Secuencia pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 318 006 T3

A continuación, se presenta una secuencia de ADNc (SEC ID N.º 18), a partir de la cual se puede expresar la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 20.

```

5
  ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTCTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAA
  1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
    M N F G L S L I F L V L V L K G V Q C E

10
  GTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTCTCTGAGGCTCTCC
  61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
    V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S

15
  TGTGCAGGCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCTCCT
  121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
    C A G S G F T F S N Y G M S W V R Q A P

20
  GGAAAGGGACTGGAGTGGGTTGCATCCATTAGGAGTGGTGGTGGTAGAACCTACTATTCA
  181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
    G K G L E W V A S I R S G G G R T Y Y S

25
  GACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTG
  241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
    D N V K G R F T I S R E N A K N S L Y L

30
  CAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTATTGTGTGATATGATCAC
  301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
    Q M N S L R A E D T A V Y Y C V R Y D H

35
  TATAGTGGTAGTCTCCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTTGGTTCACAGTCTCCTCAGCCTCC
  361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
    Y S G S S D Y W G Q G T L V T V S S A S

40
  ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
  421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
    T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T

45
  GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAAC
  481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
    A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N

50
  TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCCTCAGGACTC
  541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
    S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L

55
  TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
  601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
    Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I
  
```

ES 2 318 006 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

661 TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT 720
-----+-----+-----+-----+-----+
C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S

721 TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCA 780
-----+-----+-----+-----+-----+
C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S

781 GTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC 840
-----+-----+-----+-----+-----+
V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V

841 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG 900
-----+-----+-----+-----+-----+
T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V

901 GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGG 960
-----+-----+-----+-----+-----+
D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T

961 TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC 1020
-----+-----+-----+-----+-----+
Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y

1021 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCC 1080
-----+-----+-----+-----+-----+
K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A

1081 AAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC 1140
-----+-----+-----+-----+-----+
K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T

1141 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG 1200
-----+-----+-----+-----+-----+
K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V

1201 GAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGAC 1260
-----+-----+-----+-----+-----+
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D

1261 TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG 1320
-----+-----+-----+-----+-----+
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q

1321 GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG 1380
-----+-----+-----+-----+-----+
G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K

1381 AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEC ID N.*18) 1416
-----+-----+-----+-----+
S L S L S P G K (SEC ID N.*20)

ES 2 318 006 T3

A continuación, se presenta la secuencia completa de un gen de la cadena ligera de 3D6 humanizado con intrones (localizada entre los sitios MluI y BamHI, como en pVk-Hu3D6) (SEC ID N.º 15). El número de nucleótido indica su posición en pVk-Hu3D6. Los exones Vk y Ck están traducidos en un código de una sola letra; el punto indica el codón de terminación de la traducción. La cadena ligera madura comienza en el ácido aspártico doblemente subrayado (D). La secuencia del intrón está en cursiva. La señal de poli(A) está subrayada. La cadena ligera expresada corresponde a SEC ID N.º 11 cuando madura.

10 619 ACGCGTCCACCATGATGAGTCTGCCAGTTCCTGTTCTGTTAGTGCTCTGGATTGGGAAACCAACGGTGATGTGTG
M M S P A Q P L F L L V L W I R E T N G D V V
699 ATGACCCAGTCTCCACTCTCCTTGCTGTTACCCCTGGACAACCCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTT
M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L
779 AGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGCAACAGCGCCAGGCCAGTCTCCAAGACGCCTAATCTATCTGGTGT
D S D G K T Y L N W L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V
15 859 CTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCTCTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTC
S K L D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V
939 GAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTATGCTGGCAAGGTACACATTTTCTCGGACGTTCCGGTGGAGGCCAACAGGTGGA
E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P R T F G G G T K V E
1019 AATCAAACGTAAAGTGCACCTTCTCTTAGAAATTCTAAACTCTGAGGGGGTCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAG
I K R
20 1099 CATTGAGTTTACTGCAAGGTGAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAAATGGCTGCAAGAGCTCCAACAAAACAATTTAGAA
1179 CTTTATTAAGGAAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTAT
1259 AATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTCTCTGTCCTTAACATGCCCTGTGATTAATCCGCAAACAACACACCCAAGGGC
1339 AGAACTTTGTTACTTAAACACCAATCCCTGTTTCTCTTCCCTCAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCATCTTCCCG
T V A A P S V F I F P
25 1419 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGT
P S 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
1499 ACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T
1579 ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAG
Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q
30 1659 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCCCCACCTGCTCCTCAGTTC
G L S S P V T K S P N R G E C *
1739 CAGCCTGACCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCTCAGCTCAT
1819 CTTTACCTCACCCCTCCTCCTCTGCGCTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAA GTGAATCTT
1899 GCACCTGTGGTTTCTCTCTTCTCCTCAATTAATAATTATTATCTGTTGTTTTACCAACTACTCAATTTCTCTATAAGGGA
1979 CTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCCTTCAATCTATTTTACCCATCATCCTCTGCA
2059 AGACAGTCTCCTCAAACCCCAAGCCTTCTGTCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCTTGT
2139 TTCCCTCCTCAGCAAGCCCTCATAGTCTTTTAAAGGGTGACAGGTCTTACAGTCATATATCCTTTGATTCAATTCCT
2219 GAGAATCAACCAAGCAAATTTTCAAAGAAGAACTGCTATAAAGAGAATCATTATTGCAACATGATATAAAATAA
2299 CAACACAATAAAGCAATTAATAAACAACAATAGGAAATGTTTAAAGTTCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGT
2379 CATGCCTATTTACATTTTAAACAGGTAAGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATTGAGTACTTCCACAACCTA
2459 ATTTAATCCACACTATACTGTGAGATTAATAAATCATTAATAATGTTGCAAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATAT
40 2539 ATTCTATAACTCAGCAATCCCCTTCTAGGATC (SEC ID N.º15)

(Secuencia pasa a página siguiente)

ES 2 318 006 T3

A continuación, se presenta la secuencia completa de un gen de la cadena pesada de 3D6 humanizado con intrones (localizada entre los sitios Mlul y BamHI, como en pVg1-Hu3D6) (SEC ID N.º 16). El número de nucleótido indica su posición en pVg1-Hu3D6. Los exones V_H y C_H están traducidos en un código de una sola letra; el punto indica el codón de terminación de la traducción. La cadena pesada madura comienza en la glutamina doblemente subrayada (Q). Las secuencias de los intrones están en cursiva. La señal de poli(A) está subrayada. La cadena pesada expresada corresponde a SEC ID N.º 12 cuando madura.

5 619 ACGCGTCCACCATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACT
M N F G L S L I F L V L V L K G V Q C E V Q
10 699 GTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTCTCTGAGGCTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTCACTTTAGTAA
V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A G S S G F T F S I
15 779 CTATGGCATGTCTTGGGTTCCGACAGGCTCCTGGAAAGGCTGGAGTGGGTTGCATCCATTAGGAGTGGTGGTGGTAGAJ
Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I R S G G R
1859 CCTACTATTAGACAATGTAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAAATGAA
T Y Y S D N V K G R F T I S R E N A K N S L Y L Q M N
1939 AGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTATTGTGTCTAGATATGATCACTATAGTGGTAGCTCCGACTACTGGGGCCJ
S L R A E D T A V Y Y C V R Y D H Y S G S S D Y W G (

20 1019 GGGCACCTTGGTACAGTCTCCTCAGGTGAGTCTCACAACTCTAGAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCTGACCTTGGI
G T L V T V S S

25 1099 TTTGGGCGAGGAGGGGGCTAAGGTGAGGAGGTTGGCGCCAGGTCACACCCAAATGCCCATGAGCCAGACACTGG
1179 ACGCTGAACCTTCGGGACAGTTAAGAACCAGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCTCTGTCCACACCGGGTCACATG
1259 GCACCACCTCTCTTGCAGCCTCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCTCCAAGACACCTCTGGGGC
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G
30 1339 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCTGACCAG
T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S
1419 CGGCGTGACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCA
G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S
1499 GCTTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAAGG
S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V
35 1579 CCAGCACAGGGAGGGGCTGTCTGTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCTGGACGCATCCCGGCTATGCCAGCCCAG
1659 TCCAGGGCAGCAAGGAGGCCCCCTCTGCTTCCACCGGAGGCTCTGCCCCCACTCATGTGAGGAGAGGGTTC
1739 TTTGGCTTTTCTCCAGGCTCTGGGAGGACAGGCTAGGTGCCCTAAACCAGGCTTGCACAAAGGGGCACTGTTC
1819 TGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCTGCCCCCTGACCTAAGCCCAACCCAAAGGCCAAATCTGTC
1899 TCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCCAGATTCCAGTAATCCCAATCTTCTCTGACAGCCCAAAATCTTGTGAC
E P K S C D
40 1979 AAAACTCACACATGCCACCCTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCTCGCCCTCAGCTCAAGGGGGACAGGTGCCCTAG
K T H T C P P C P
2059 AGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGTGTGACCGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACCTCTG
A P E L L
45 2139 GGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGT
G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V
2219 GGTGGTGGAGTGAAGCCAGAACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
V V D V S H E D P E V K A L F P A P I E K T I S K A K
50 2299 CAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCCAGCGTCTCACCGTCTGACCCAGGACTGGCTGAAT
T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H O D W L N
2379 GGCAAGGAGTACAAGTCAAGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGG
G K E Y K C K V S N K A L F P A P I E K T I S K A K
55 2459 GACCCCTGGGTCGAGGGCCACATGGACAGAGGCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTACCGCTGTACCAACC
2539 TCTGCTCCATCAAGGACAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V
60 2619 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
S L T C L V K G P Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
2699 ACTACAAGACACCGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
70 2779 TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T O G K S L
2859 GTCTCCGGGTAATGAGTGCAGCGCCGGCAAGCCCTCCCGGCTCTCGGGTGCACAGGATGCTTGGCACGT
S P G K *
80 2939 ACCCCCTGTACATACTTCCCGGGCCCGCAGCATGGAATAAA GCACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCTGCGAGACTGTGAT
3019 GGTTCCTTCCACGGGTCAGGCCGAGTCTGAGGCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACTG
3099 GCCCAGGCTGTGAGGTGTCTTGGGCGCTTAGGGTGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCCTCCGACAGGTTGGGGATTGTC
3179 CAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCCTGCTGGCTGGCCACGGGAAGCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACACA
3259 GCCCCTGCCTGTAGGAGACTGTCTGTCTGTGAGCGCCCTGTCTCCGACCTCCATGCCCACTGGGGGATGCCCTA
3339 GTCCATGTGCTAGGGACAGGCCCTCCCTCACCCATCTACCCCCAGGCACTAACCCCTGGCTGCCCTGCCAGCCTCGC
3419 ACCCGCATGGGGACAACACGACTCCGGGACATGCACTCTCGGGCCCTGTGGAGGGACTGGTGCAGATGCCACACACA
3499 CACTCAGCCAGACCCGTTCAACAAACCCCGCAGCTGAGTTGGCCGGCCACAGGCCACACACAGACAGCCCT
3579 CACACCGGAGCCTCACCCGGGCGAAGTGCACAGCAGCCAGAGCAAGGCTCTCGCACAGTGAACACTCTCTCGGA
3659 CACAGGCCCCAGAGCCCAAGCGGCACCTCAAGGCCACAGGCTCTCGGACGCTCTCCACATGTGACCTGCTCAG
3739 ACAAAACCCAGCCCTCTCTCAAGGGTGCCTGACCGCCACACACACAGGGGATCACACACCGTCAAGTCCC
3819 TGGCCCTGGCCACTTCCAGTGCAGCCCTTCCCTGCAAGTCC (SEC ID N.º16)

Es posible aislar las secuencias de ADN de la región constante humana según procedimientos conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferiblemente, a partir de células-B inmortalizadas. Las células fuente adecuadas para las secuencias de polinucleótidos, y las células huésped para la expresión y la secreción de inmunoglobulina se pueden obtener a partir de un número de fuentes conocidas en la técnica.

Además de las inmunoglobulinas humanizadas descritas específicamente en la presente memoria, se pueden diseñar y fabricar otras inmunoglobulinas modificadas “sustancialmente homólogas” utilizando diversas técnicas de ADN recombinante conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las regiones marco pueden variar con respecto a las secuencias nativas en el nivel de estructura primaria mediante varias sustituciones de aminoácidos, adiciones y eliminaciones terminales e intermedias, y similares. Además, se puede usar una variedad de diferentes regiones marco humanas individualmente o en combinación como base para las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención. En general, las modificaciones de los genes se pueden realizar fácilmente mediante una variedad de técnicas conocidas, tales como mutagénesis de sitio dirigida.

Alternativamente, se pueden producir fragmentos polipeptídicos que sólo comprendan una parte de la estructura primaria del anticuerpo; fragmentos que poseen una o más actividades de la inmunoglobulina (p. ej., actividad de fijación de complementos). Se pueden producir estos fragmentos polipeptídicos mediante la escisión proteolítica de anticuerpos intactos mediante procedimientos conocidos en la técnica, o insertando codones de terminación en las partes deseadas de los vectores usando una mutagénesis de sitio dirigida, tales como detrás de CH1 para producir fragmentos Fab o detrás de la región bisagra para producir fragmentos F(ab')₂. Se pueden producir anticuerpos monocatenarios uniendo VL y VH con un ligador de ADN.

Según lo afirmado anteriormente, los polinucleótidos serán expresados en huéspedes una vez que las secuencias hayan sido ligadas operativamente a (i.e., colocadas para garantizar el funcionamiento de) una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión son comúnmente duplicables en los organismos huésped bien como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, 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 huésped procarionta particularmente útil para la clonación de los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariontas, es posible hacer también vectores de expresión, que comúnmente contendrán las secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (p. ej., un origen de replicación). Además, puede estar presente cualquiera de entre un número de promotores conocidos, tales como el sistema promotor de la lactosa, un sistema promotor del triptófano (*trp*), un sistema promotor de la beta-lactamasa o un sistema promotor del fago Lambda. Los promotores controlarán comúnmente la expresión, opcionalmente, con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitio de unión al ribosoma, y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

También se pueden usar para la expresión otros microbios tales como la levadura. *Saccharomyces* es un huésped preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según lo deseado.

Además de microorganismos, también se puede usar cultivo celular de tejido de mamíferos para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención. Las células eucariotas son las realmente preferidas, porque se ha desarrollado un número de líneas celulares huéspedes adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas en la técnica, e incluyen las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, las líneas de células de ovario de hámster sirio, las células HeLa, preferiblemente, líneas celulares de mieloma, células B transformadas, líneas celulares de riñón embrionario humano o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador y los sitios de procesamiento de la información necesarios tales como los sitios de unión al ribosoma, los sitios de corte y empalme del ARN, los sitios de poliadenilación y las secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, los adenovirus, el virus del papiloma bovino, el citomegalovirus y similares.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (p. ej., las secuencias codificantes de las cadenas pesadas y ligeras, y las secuencias de control de la expresión) se pueden transferir a la célula huésped mediante procedimientos conocidos, que varían en función del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariontas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden usar para otros huéspedes celulares.

Una vez expresados, los anticuerpos se pueden purificar mediante procedimientos estándar, incluyendo la precipitación en sulfato de amonio, el intercambio iónico, la afinidad, la fase inversa, la cromatografía en columna mediante interacción hidrófoba, la electroforesis sobre gel y similares. Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras de una homogeneidad de al menos aproximadamente el 90 al 95%, siendo lo más preferido una homogeneidad del 98 al 99%, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta su homogeneidad según lo deseado, ya se pueden usar los polipéptidos terapéuticamente o profilácticamente, como se indica en la presente memoria.

ES 2 318 006 T3

Se administran los anticuerpos (incluyendo los fragmentos inmunológicamente reactivos) a un sujeto en riesgo de presentar o que presenta síntomas o una patología relacionados con el A β , tales como la enfermedad de Alzheimer clínica o pre-clínica, el síndrome de Down o la angiopatía amiloide clínica o pre-clínica, usando técnicas de administración estándar, preferiblemente, periféricamente (i.e., no mediante una administración en el sistema nervioso central) mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o mediante un supositorio. Aunque es posible administrar los anticuerpos directamente en el sistema ventricular, el fluido espinal o el parénquima cerebral, y las técnicas para acceder a estas zonas son conocidas en la técnica, no es necesario utilizar estos procedimientos tan complejos. Los anticuerpos de la invención son eficaces cuando se administran mediante las técnicas más simples basadas en el sistema circulatorio periférico. Las ventajas de la presente invención incluyen la capacidad del anticuerpo para ejercer sus efectos beneficiosos incluso aunque no se proporcione directamente en el propio sistema nervioso central. De hecho, se ha demostrado que la cantidad de anticuerpo que atraviesa la barrera hematoencefálica es de < 0,1% de los niveles en plasma.

Las composiciones farmacéuticas por ser administradas están diseñadas para que sean apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se usan según lo apropiado excipientes farmacéuticamente aceptables tales como, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes isotónicos, agentes estabilizantes y similares. "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton PA, última edición, incorporado en la presente memoria por referencia, proporciona un compendio de técnicas de formulación conocidas por los profesionales en general.

La concentración del anticuerpo humanizado en las formulaciones puede variar de una concentración tan baja como el 0,1% hasta una tan elevada como el 15 o el 20% en peso, y será seleccionada fundamentalmente en base a los volúmenes, las viscosidades de los fluidos, etcétera, según el modo de administración particularmente seleccionado. De este modo, una composición farmacéutica para inyección podría ser elaborada para contener en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato de 1 a 100 mg del anticuerpo humanizado de la presente invención. La formulación podría ser filtrada en condiciones estériles tras su elaboración, o convertida en microbiológicamente aceptable de otro modo. Una composición típica para una infusión intravenosa podría tener un volumen de tanto como 250 ml de fluido, tal como la solución de Ringer estéril, y 1-100 mg por ml o más de concentración de anticuerpo. Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar para su almacenamiento, y reconstituirlos en un vehículo estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo (p. ej., con globulinas inmunes convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG). Puede que sea necesario ajustar las dosis para compensar. El pH de la formulación será seleccionado para equilibrar la estabilidad de los anticuerpos (química y física) y para la comodidad del paciente cuando se administre. Generalmente, se tolera un pH de entre 4 y 8.

Aunque los siguientes procedimientos parecen ser los más convenientes y más apropiados para la administración de proteínas tales como los anticuerpos humanizados, mediante una adaptación adecuada, se pueden emplear otras técnicas de administración, tales como la administración transdérmica y la administración oral, siempre y cuando el diseño de la formulación sea el adecuado. Además, puede ser deseable emplear formulaciones de liberación controlada usando películas y matrices biodegradables, o mini-bombas osmóticas, o sistemas de administración basados en perlas de dextrano, alginato o colágeno. En resumen, hay formulaciones disponibles para la administración de los anticuerpos de la invención y son conocidas en la técnica, y pueden ser seleccionadas de entre una variedad de opciones. Es posible optimizar los niveles de dosificación más comunes usando técnicas clínicas estándar, y dependerá del modo de administración y del estado del paciente.

Como los ejemplos de la presente memoria describen experimentos llevados a cabo en sistemas murinos, el uso de anticuerpos monoclonales murinos resulta satisfactorio. Sin embargo, en los procedimientos de tratamiento de la invención destinados al uso humano, se prefieren las formas humanizadas de los anticuerpos con la inmunoespecificidad correspondiente a la del anticuerpo 3D6.

Ejemplo 1

Síntesis del anticuerpo humanizado 3D6

Células y anticuerpos. Se obtuvo línea celular de mieloma de ratón Sp2/0 de ATCC (Manassas, VA) y se mantuvo en medio de DME que contenía SBF al 10% (n.º de cat. SH30071.03, HyClone, Logan, UT) en una incubadora de CO₂ a 37°C. Primero se cultivaron células de hibridoma de 3D6 de ratón en medio RPMI-1640 que contenía SBF al 10% (HyClone), HEPES 10 mM, glutamina 2 mM; aminoácidos no esenciales 0,1 mM; piruvato de sodio 1 mM; y 25 µg/ml de gentamicina, y luego se expandieron en medio libre de suero (SFM de hibridoma, n.º de cat. 12045-076, Life Technologies, Rockville, MD) que contenía SBF de Ig bajo al 2% (n.º de cat. 30151.03, HyClone) hasta un volumen de 1,5 litros en frascos rotativos. Se purificó el anticuerpo monoclonal de ratón 3D6 (Mu3D6) a partir del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía de afinidad usando una columna de sefarosa-proteína G. Se preparó Mu3D6 biotinilado usando Sulfo-NHS-LC-LC-Biotina EZ-Link (n.º de cat. 21338ZZ, Pierce, Rockford, IL).

Clonación de ADNc de la región variable. Se extrajo ARN total de aproximadamente 10⁷ células de hibridoma usando reactivo de TRIzol (n.º de cat. 15596-026 Life Technologies), y se aisló ARN de poli(A)⁺ con el sistema de aislamiento de ARNm PolyATract (n.º de cat. Z5310, Promega, Madison, WI) según los protocolos del proveedor. Se sintetizó ADNc bicatenario usando el equipo de amplificación de ADNc SMARTTMRACE (n.º de cat. K1811-1,

ES 2 318 006 T3

Clontech, Palo Alto, CA), siguiendo el protocolo del proveedor. Se amplificaron los ADNc de las regiones variables para las cadenas ligeras y pesadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores 3' que se aparearon respectivamente con las regiones constantes de la cadena kappa y gamma de ratón, y un cebador universal 5' proporcionado en el equipo de amplificación de ADNc SMART™RACE. Para la PCR de las VL, el cebador 3' tiene la secuencia:

5'-TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3' [SEC ID N.º 13]

con los residuos 17-46 en hibridación con la región Ck de ratón. Para la PCR de las VH, los cebadores 3' tienen la secuencia:

5' - TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTTGGC - 3'
 A G T
 T
 (SEC ID N.º14)

con los residuos 17-50 en hibridación con la región CH1 de la cadena gamma de ratón. Se subclonaron los ADNc de las VL y VH en el vector pCR4Blunt-TOPO (n.º de cat. 45-0031, Invitrogen, Carlsbad, CA) para la determinación secuencial. La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante reacciones de secuenciación de ciclos de PCR con terminadores de cadena dideoxi fluorescentes (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Se analizaron las reacciones de secuenciación sobre un secuenciador de ADN modelo 377 (Applied Biosystems).

Construcción de regiones variables de 3D6 humanizado (Hu3D6). La humanización de las regiones V del anticuerpo de ratón se llevó a cabo como se explica resumidamente en Queen *et al.*, (1989), *op. cit.* Se eligió el marco de la región V humana usado como aceptor para las CDR de Mu3D6 en base a la homología secuencial. Se usaron los programas informáticos ABMOD y ENCAD [Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620 (1983)] para construir un modelo molecular de las regiones variables. Se sustituyeron los aminoácidos de las regiones V humanizadas de los que se predijo que estaban en contacto con las CDR por los residuos correspondientes de Mu3D6. Esto se hizo en los residuos 49, 73 y 98 de la cadena pesada y en el residuo 41 de la cadena ligera. Los aminoácidos de la región V humanizada que se encontraron poco comunes en el mismo subgrupo de la región V fueron cambiados a los aminoácidos consenso para eliminar una posible inmunogenicidad. Esto se hizo en los residuos 6 y 91 de la cadena pesada.

Se construyeron los genes de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, y se amplificaron usando ocho oligonucleótidos sintéticos solapantes con una longitud variable de aproximadamente 65 a 80 bases [He, X. Y., *et al.*, *J. Immunol.* 160: 029-1035 (1998)]. Se aparearon los oligonucleótidos por parejas y se prolongaron con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I, produciendo cuatro fragmentos bicatenarios. Se desnaturalizaron los fragmentos resultantes, se aparearon por parejas y se prolongaron con Klenow, produciendo dos fragmentos. Se desnaturalizaron estos fragmentos, se aparearon por parejas y se prolongaron una vez más, produciendo un gen de longitud completa. Se amplificó el producto resultante mediante PCR usando el sistema de PCR de alta fidelidad Expand (n.º de cat. 1 732 650, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Se purificaron sobre gel los fragmentos amplificados mediante PCR y se clonaron en el vector pCR4Blunt-TOPO. Tras la confirmación secuencial, se digirieron los genes de VL y VH con MluI y XbaI, se purificaron sobre gel y se subclonaron respectivamente en vectores de expresión de cadenas ligeras y pesadas para formar pVk-Hu3D6 y pVg1-Hu3D6 [Co, M. S., *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1149- 1154 (1992)]. El anticuerpo 3D6 humanizado maduro expresado a partir de estos plásmidos tiene la cadena ligera de SEC ID N.º 11 y la cadena pesada de SEC ID N.º 12.

Transfección estable. Se realizó una transfección estable a una línea celular de mieloma de ratón Sp2/0 mediante electroporación usando un aparato Gene Pulser (BioRad, Hercules, CA) a 360 V y 25 µF según lo descrito (Co, *et al.*, 1992, *op. cit.*). Antes de realizar la transfección, se linealizaron los ADN de los plásmidos pVk-Hu3D6 y pVg1-Hu3D6 usando FspI y BstZ171, respectivamente. Se transfectaron aproximadamente 10⁷ células Sp2/0 con 20 µg de pVk-Hu3D6 y 40 µg de pVg1-Hu3D6. Se suspendieron las células transfectadas en medio de DME que contenía SBF al 10% y se emplacaron en varias placas de 96 pocillos. Tras 48 h, se aplicó medio de selección (medio de DME que contenía FBS al 10%, complemento de medio de HT; 0,3 mg/ml de xantina y 1 µg/ml de ácido micofenólico). Se analizaron los sobrenadantes de los cultivos en cuanto a la producción de anticuerpo mediante ELISA aproximadamente 10 días después del inicio de la selección, como se muestra a continuación. Se prolongaron los clones de producción elevada en medio de DME que contenía SBF al 10% y se analizaron una vez más en cuanto a la expresión de anticuerpo. Entonces se adaptaron los clones seleccionados al cultivo en SFM de hibridoma.

Medición de la expresión de anticuerpo mediante ELISA. Se revistieron pocillos de una placa para ELISA de 96 pocillos (placa Nunc-Immuno, n.º de cat. 439454, NalgeNunc, Naperville, IL) con 100 µl de 1 µg/ml IgG de cabra anti-humana, Fc y fragmento específico, anticuerpos policlonales (n.º de cat. 109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en tampón de bicarbonato-carbonato de sodio 0,2M (pH 9,4) durante una noche a 4°C. Tras lavar con tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,1%), se bloquearon los pocillos con 400 µl de tampón de bloqueo Superblock (n.º de cat. 37535, Pierce) durante 30 min y luego se lavaron con tampón de lavado. Se diluyeron

ES 2 318 006 T3

adecuadamente las muestras que contenían Hu3D6 en tampón de ELISA (PBS que contenía ASB al 1% y Tween 20 al 0,1%) y se aplicaron sobre placas de ELISA (100 μ l por pocillo). Como anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CD33 humanizado estándar, se usó HuM195 (Co, *et al.*, 1992, *op. cit.*). Se incubó la placa de ELISA durante 2 h a temperatura ambiente y se lavaron los pocillos con tampón de lavado. Luego se aplicaron a cada pocillo 100 μ l de anticuerpos policlonales kappa anti-humanos de cabra conjugados con HRP diluidos 1/1.000 (n.º de cat. 1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) en tampón de ELISA. Tras incubar durante 1 h a temperatura ambiente y lavar con tampón de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de sustrato de ABTS (n.º de cat. 507602 y 506502, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se detuvo el desarrollo del color añadiendo 100 μ l de ácido oxálico al 2% por pocillo. Se leyó la absorbancia a 415 nm usando un lector de microplacas OPTImax (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Purificación de Hu3D6. Se adaptó uno de los transfectantes estables de Sp2/0 que expresaban Hu3D6 (clon n.º 40) al cultivo en SFM de hibridoma y se amplió hasta 2 litros en frascos rotativos. Se cosechó el sobrenadante del cultivo agotado cuando la viabilidad de las células alcanzó el 10% o menos, y se cargó sobre una columna de sefarosa-proteína A. Se lavó la columna con PBS antes de eluir el anticuerpo con clorhidrato de glicina 0,1M (pH 2,5) y NaCl 0,1M. Se sometió a diálisis la proteína eluída frente a 3 cambios de 2 litros de PBS, y se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m antes de su 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 una electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS en tampón de tris-glicina según los procedimientos estándar sobre un gradiente de gel de 4-20% (n.º de cat. EC6025, Novex, San Diego, CA). Se reduce el anticuerpo 3D6 humanizado purificado y se ejecuta sobre un gel de electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS. El anticuerpo entero muestra dos bandas de pesos moleculares aproximados de 25 kDa y 50 kDa. Estos resultados coinciden con los pesos moleculares de la cadena ligera y la cadena pesada, o con el peso molecular de las cadenas que comprenden un fragmento, calculados a partir de las composiciones de sus aminoácidos.

Ejemplo 2

Propiedades de unión in vitro del anticuerpo 3D6 humanizado

Se comparó la eficacia de unión del anticuerpo 3D6 humanizado, sintetizado y purificado según lo descrito anteriormente, con el anticuerpo 3D6 de ratón usando anticuerpo 3D6 de ratón biotinilado en un ELISA comparativo. Se revistieron pocillos de una placa para ELISA de 96 pocillos (placa Nunc-Immuno, n.º de cat. 439454, NalgeNunc) con 100 μ l de péptido β -amiloidé (1-42) en tampón de bicarbonato-carbonato de sodio 0,2M (pH 9,4) (0,3 μ g/ml) durante una noche a 4°C.

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

Se añadieron por triplicado una mezcla de Mu3D6 biotinilado (0,2 μ g/ml de concentración final) y anticuerpo competidor (Mu3D6 o Hu3D6; partiendo de una concentración final de 300 μ g/ml y haciendo diluciones en serie por triplicado) en tampón de ELISA en un volumen final de 100 μ l por pocillo. Como control no competidor, se añadieron 100 μ l de 0,2 μ g/ml de Mu3D6 biotinilado. Como control de fondo, se añadieron 100 μ l de tampón de ELISA. Se incubó la placa de ELISA a temperatura ambiente durante 90 min. Tras lavar los pocillos con tampón de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de 1 μ g/ml de estreptavidina conjugada con HRP (n.º de cat. 21124, Pierce). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 min y se lavó con tampón de lavado. Para el desarrollo del color, se añadieron 100 μ l/pocillo de sustrato de peroxidasa ABTS (Kirkegaard & Perry Laboratories). Se detuvo el desarrollo del color añadiendo 100 μ l/pocillo de ácido oxálico al 2%. Se leyó la absorbancia a 415 nm. Se representaron las absorbancias frente al logaritmo de la concentración de competidor, se ajustaron las curvas hasta los puntos de datos (usando Prism) y se determinó la CI_{50} para cada anticuerpo usando procedimientos conocidos en la técnica.

La CI_{50} media para el 3D6 de ratón fue de 2,7 μ g/ml (tres experimentos separados, desviación estándar = 0,6 μ g/ml) y para el 3D6 humanizado fue de 3,3 μ g/ml (tres experimentos separados, desviación estándar = 0,8 μ g/ml). Se llevó a cabo una segunda serie de tres experimentos, esencialmente según lo descrito anteriormente, y se determinó la CI_{50} media para el 3D6 de ratón en 3,97 μ g/ml (DE = 0,15 μ g/ml) y para el 3D6 humanizado, se determinó la CI_{50} en 3,97 μ g/ml (DE = 0,20 μ g/ml). En base a estos resultados, se concluye que el 3D6 humanizado tiene propiedades de unión que son muy similares a las del anticuerpo 3D6 de ratón. Por lo tanto, se espera que el 3D6 humanizado tenga actividades *in vitro* e *in vivo* muy similares en comparación con el 3D6 de ratón y que presente en seres humanos los mismos efectos demostrados en ratones con el 3D6 de ratón.

Ejemplo 3

Propiedades de unión in vitro del anticuerpo 3D6 de ratón y humanizado

Se determinó la afinidad de los anticuerpos ($KD = Kd/Ka$) usando el biosensor 2000 de BIAcore, y se analizaron los datos con el programa informático BIAevaluation (v. 3.1). Se acopló un anticuerpo de captura (IgG de conejo anti-ratón o anti-humano) por los grupos amino libres a los grupos carboxilo sobre una celda de flujo 2 de un chip biosensor (CM5) usando N-etil-N-dimetilaminopropil carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS). Se acopló

ES 2 318 006 T3

IgG de conejo inespecífica a la celda de flujo 1 como control de fondo. Se capturaron los anticuerpos monoclonales hasta producir 300 unidades de resonancia (UR). Se hizo fluir entonces beta-amiloide 1-40 o 1-42 (Biosource International, Inc.) sobre el chip a concentraciones decrecientes (KD de 1.000 a 0,1 veces). Para regenerar el chip, se eluyó anticuerpo anti-A β unido desde el chip usando un lavado con clorhidrato de glicina (pH 2). Una inyección de control que no contenía beta-amiloide sirvió como control para la sustracción de línea de base. Los diagramas del sensor que demostraban las fases de asociación y disociación fueron analizados para determinar la K_d y la K_a. Se determinó la afinidad (KD) del anticuerpo de ratón 3D6 por el A β 1-42 en 2,4 nM, y la afinidad del 3D6 humanizado, preparado esencialmente según lo descrito en el ejemplo 1, se determinó en 2,3 nM.

10 Ejemplo 4

Mapeado de epítomos de 3D6 humanizado y de ratón

El BIAcore es un sistema biosensor automático para medir las interacciones moleculares [Karlsson R., *et al. J. Immunol. Methods* 145: 229-240 (1991)]. La ventaja del BIAcore frente a otros análisis de unión es que se puede medir la unión del antígeno sin tener que marcar ni inmovilizar el antígeno (i.e., el antígeno mantiene una configuración más nativa). La metodología BIAcore se usó para evaluar la unión de diversos fragmentos de péptido beta-amiloide con bien 3D6 de ratón o 3D6 humanizado (preparados sustancialmente según lo descrito en el ejemplo 1). Todas las diluciones se realizaron con solución salina tamponada con HEPES que contenía Tween 20. Se usó una sola concentración de una variedad de fragmentos de A β humano o A β 1-40 de ratón (BioSource International). Los fragmentos de beta-amiloide humano 1-10 y 1-20 se unieron con el 3D6 de ratón y con el 3D6 humanizado, mientras que los fragmentos de A β humano 10-20 y 16-25 no se unieron con ningún anticuerpo. Ni el 3D6 de ratón ni el 3D6 humanizado se unieron con el A β 1-40 de ratón. Mediante el uso de esta metodología, el epítipo de unión tanto para el 3D6 de ratón como para el 3D6 humanizado parece estar entre los aminoácidos 1 y 10 del A β humano.

25 Ejemplo 5

Efectos de la administración de 3D6

30 A no ser que se indique lo contrario, todos los estudios usaron ratones transgénicos APP^{V717F} (PDAPP) y todas las inyecciones fueron i.p. En general, un grupo control de ratones recibió inyecciones de solución salina.

Seis semanas de inyección semanal de 360 μ g de 3D6 en ratones hemigénicos viejos (24 meses) descendió el A β _{total} insoluble en el hipocampo en un 10% y el A β 1-42 en un 1% (N.S., no significativo estadísticamente) en 9 animales por grupo de control y 10 animales por grupo de anticuerpo. En el córtex, el A β _{total} insoluble medio fue reducido en un 33% y el A β 1-42 en un 47% (p < 0,05), mientras que el A β 1-40 aumentó en un 100%.

En ratones de 4 meses de edad hemigénicos, la administración de 360 μ g de 3D6 por animal: 1) aumentó los niveles medios de A β 1-40 y A β 1-42 en plasma aproximadamente 6 veces más y 9 veces más, respectivamente, a las 24 horas de la administración; y 2) no tuvo un efecto significativo sobre el A β 1-40 soluble en el córtex tras 24 horas en comparación con el control de solución salina (5 animales por grupo). En otro estudio con ratones de 3 meses de edad hemigénicos, la administración de 360 μ g de 3D6 por animal aumentó los niveles medios de A β 1-42 en plasma en aproximadamente 8 veces más a las 24 horas de la administración.

45 La administración de 360 μ g de 3D6 por animal (5 animales por grupo, control de solución salina): aumentó los niveles medios de A β 1-40 y A β 1-42 en plasma aproximadamente 92 veces más y 32 veces más, respectivamente, a las 24 horas de la administración (p < 0,05); descendió el A β 1-40 insoluble cortical en un 42% (p < 0,05) y el A β 1-42 en un 27% (N.S.), pero aumentó el A β _{total} en un 35% (N.S.); no tuvo un efecto constante o significativo sobre el A β 1-40, el A β 1-42 o el A β _{total} soluble o insoluble en el hipocampo tras 24 horas; en el cerebelo, aumentó el A β 1-42 soluble en un 80% (p < 0,001) y el A β _{total} en un 68% (N.S.), pero descendió el A β 1-40 soluble en un 6% (N.S.); y en el cerebelo, descendió el A β 1-40, el A β 1-42 y el A β _{total} insoluble en un 35% (p < 0,01), en un 21% (N.S.) y en un 12% (N.S.), respectivamente.

55 En ratones jóvenes, la administración de 360 μ g de 3D6 por animal (5 por grupo): 1) aumentó los niveles medios de A β 1-42 en plasma aproximadamente 3 veces más a las 24 horas de la administración; y 2) en el córtex, descendió el A β 1-40 insoluble en aproximadamente el 10% y aumentó el A β 1-42 insoluble en aproximadamente el 12%.

60 Se realizaron estudios para evaluar los efectos del 3D6 sobre la formación de complejos de A β :anticuerpo estables en fluidos biológicos, las concentraciones de A β en plasma exactamente después de la administración, el rendimiento cognitivo tras una administración aguda o crónica, y la deposición de A β extraído con guanidina y detectado inmunohistoquímicamente (en el cerebro) tras la administración crónica.

65 Se inyectaron 360 μ g de 3D6 a ratones (de 3 meses de edad). Veinticuatro horas después de la administración del anticuerpo, se recogió plasma y se resolvieron las proteínas mediante electroforesis sobre gel en condiciones nativas (no desnaturalizantes) sobre un gel de poliacrilamida. Tras la transferencia de proteínas partidas a una matriz sólida, se inmunodetectaron los complejos con anticuerpo biotinilado y se visualizaron con un aumento de la quimioluminiscencia. A diferencia de otros ciertos anticuerpos anti-A β , no se detectó ningún complejo con 3D6.

ES 2 318 006 T3

Se inyectó 3D6 a ratones jóvenes (de 2-3 meses de edad). Se recogió plasma en diversos momentos posteriores a la administración del anticuerpo y se determinaron diversas especies de $A\beta$ mediante un ELISA de tipo sándwich. La administración de 3D6 dio como resultado un aumento dependiente de la dosis y del tiempo de los niveles de $A\beta$ en plasma. Los niveles de $A\beta_{1-40}$ aumentaron hasta un mayor grado que los niveles de $A\beta_{1-42}$ tras la administración de 3D6. En un estudio adicional, se trataron ratones tg APP^{V717F} jóvenes con 360 μg de 3D6 y se midieron los niveles de $A\beta$ en plasma a la 0,5, 3, 6 y 24 h de la inyección. El 3D6 aumentó los niveles de $A\beta$ en plasma de una manera dependiente del tiempo.

Se ha realizado una amplia caracterización del comportamiento de los ratones tg APP^{V717F} usando varios paradigmas de la memoria (presión de la barra, laberinto radial de 8 brazos, reconocimiento de objetos). Estos ratones tienen dañadas varias tareas de aprendizaje y de la memoria, y los déficit en la tarea de reconocimiento de objetos (RO) empeoran con la edad. Por lo tanto, se ha usado la tarea de RO para evaluar el aprendizaje y la memoria en ratones tg APP^{V717F}. El rendimiento de la tarea de RO depende preferiblemente de la integridad del lóbulo temporal medio (cortezas peririnal y entorrinal). El análisis del RO se basa en la tendencia espontánea de los roedores para explorar preferiblemente un objeto nuevo frente a uno conocido.

El primer día de la prueba, se dejó que los ratones se habituaran a una cámara de campo abierto durante 50 minutos. El día siguiente, se volvieron a colocar los ratones en el campo abierto para dos pruebas de 10 min. Durante la prueba uno, se dejó que los ratones exploraran el campo abierto en presencia de un objeto (p. ej., una canica o un dado). Tras un intermedio de 3 horas, se volvieron a colocar los ratones en el campo abierto con el objeto conocido (el mismo objeto explorado anteriormente durante la prueba 1), así como con un objeto nuevo. Se registró el tiempo empleado en explorar el nuevo objeto, así como el empleado en el objeto conocido, y se calculó un índice de reconocimiento para cada ratón (la proporción del tiempo empleado en explorar el nuevo objeto \times 100/tiempo total empleado en explorar los dos objetos). La administración de 360 μg de 3D6 por animal 24 horas antes de la sesión de habituación en ratones tg APP^{V717F} de 11-12 meses de edad mejoró el rendimiento del RO en 2 de los 8 ratones analizados ($p < 0,05$).

Se administraron inyecciones semanales de PBS y de 72, 217 y 360 μg de una IgG inespecífica o 3D6 ($n = 19-30$) durante 5 meses a ratones tg homocigóticos (de 5-6 meses de edad). En una necropsia, se extirparon los cerebros y se procesaron para los análisis de ELISA para el $A\beta$ y los análisis inmunohistoquímicos de la carga de $A\beta$ parenquimal. Se homogeneizaron los tejidos corticales y del hipocampo en PBS. Se extrajo posteriormente $A\beta$ insoluble en PBS de los sedimentos mediante la homogenización en clorhidrato de guanidina 5,5M. Tras la homogenización, se sometieron las muestras a un ligero movimiento de rotación durante al menos 24 horas antes de la centrifugación y la recogida del extracto de guanidina. Se almacenaron las preparaciones de tejido solubles en PBS y extraídas con guanidina a -80°C para las posteriores determinaciones del $A\beta$ mediante ELISA. Se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico (IHC) de la carga de $A\beta$ parenquimal como se explica a continuación. Se marcaron ocho (8) μm de tejidos fijados en paraformaldehído incluidos en parafina con anticuerpo anti- $A\beta$ policlonal de conejo (frente a $A\beta$ 15-30), siguiendo con la detección fluorescente de IgG anti-conejo. Se examinaron ocho (8) secciones de cerebro (7 IHC, 1 control) de cada animal. El tratamiento con 3D6 (360 μg) redujo notable y significativamente el $A\beta_{1-42}$ extraído con guanidina cortical (mediante ELISA) y la carga de la placa de $A\beta$ cortical y del hipocampo (mediante IHC), pero no se observó ningún efecto a dosis inferiores de 3D6. Aunque no se observó ningún efecto sobre el $A\beta_{1-42}$ extraído con guanidina a dosis inferiores de 3D6, estas dosis redujeron significativamente la carga de la placa de $A\beta$ cortical y del hipocampo (mediante IHC).

Se administró 3D6 radiomarcado (15 μCi /ratón; 0,5 mg/ratón) a ratones ICR (no transgénicos) para evaluar las cinéticas y la distribución cerebral del anticuerpo tras su administración por vía intravenosa. Las cinéticas en plasma de la inmunoreactividad del 3D6 demostraron una vida media de eliminación de aproximadamente 5 días. La radiactividad precipitable en TCA fue mayor del 95% de los recuentos en plasma totales realizados durante el estudio, y descendió en el compartimento plasmático con una vida media terminal de 3-4 días. La observación de que la radiactividad plasmática permaneciera predominantemente precipitable en TCA a lo largo del estudio sugiere que el anticuerpo radiomarcado no fue significativamente degradado proteolíticamente, y que el marcador de ¹²⁵I no fue escindido del anticuerpo en el transcurso del estudio. Las formas de los perfiles de concentración frente a tiempo medidos mediante ELISA y la radiactividad fueron generalmente similares, con algunas diferencias en las fases terminales. No se produjo una acumulación aparente del radiomarcador en ningún tejido, incluyendo el cerebro. La distribución de la radiactividad hacia el cerebro fue mínima. No es posible distinguir claramente la cantidad de radiactividad asociada con las muestras cerebrales en este experimento de la contaminación generada por el compartimento sanguíneo durante el procesamiento de los tejidos o del anticuerpo asociado con las células endoteliales de la vasculatura cerebral.

Se administró PBS, una IgG inespecífica o 3D6 (500 μg /semana) a ratones hemicigóticos de nueve meses de edad mediante una inyección semanal durante seis meses (PBS, 11 animales, IgG, 13 animales; y 3D6, 14 animales). Se observó un descenso del $A\beta$ débil, pero estadísticamente significativo, en el córtex (en comparación con la IgG) y en el hipocampo (en comparación con la IgG o los controles con PBS/IgG combinados). El análisis inmunohistoquímico (IHC) mostró fuertes reducciones en la carga de la placa de $A\beta$ en el córtex y en el hipocampo de los ratones tratados con 3D6 (reducciones del 94% y del 85%, respectivamente, frente al control de PBS; $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).

Ejemplo 6

Administración de 3D6 humanizado

5 Se administró una preparación de anticuerpo anti- $A\beta$ que comprendía una cadena ligera que tenía la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 11 y una cadena pesada que tenía la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 12 (un 3D6 humanizado) como una sola inyección en bolo intravenoso a dos grupos de 12 monos tíjes macho a dosis de 1 y 10 mg/kg. Las concentraciones de anticuerpo anti- $A\beta$ inmunorreactivo descendieron con una vida media de eliminación de aproximadamente 4 días. Los parámetros de C_{max} y ABC aumentaron proporcionalmente entre los niveles de dosis de 1 y 10 mg/kg. La administración de 3D6 humanizado a los monos tíjes dio como resultado un aumento de 18 o 29 veces mayor de la inmunorreactividad del $A\beta_{1-40}$ en plasma tras 8 horas, en comparación con las concentraciones de las dosis previas de los grupos de dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente. Los animales a ambos niveles de dosis presentaron concentraciones de inmunorreactividad del $A\beta_{1-40}$ por encima de los niveles de la línea de base hasta 2 semanas después de la administración del anticuerpo. El análisis cinético de las concentraciones de inmunorreactividad de $A\beta_{1-40}$ mostró que la vida media de eliminación de la inmunorreactividad del $A\beta_{1-40}$ era comparable a la del anticuerpo (~4 días). También se evaluaron las farmacocinéticas del 3D6 humanizado en monos *cynomolgus* macho tras una sola administración intravenosa de 1 mg/kg. El análisis de la inmunorreactividad mostró que el 3D6 humanizado fue eliminado del plasma con una vida media de aproximadamente 11-12 días.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal, o un fragmento inmunológicamente eficaz del mismo, que comprende la secuencia dada por SEC ID N.º 9 y la secuencia dada por SEC ID N.º 10.
2. Un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia dada por SEC ID N.º 9 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada por SEC ID N.º 10.
- 10 3. Un anticuerpo monoclonal que tiene una cadena ligera de la secuencia dada por SEC ID N.º 11 y una cadena pesada de la secuencia dada por SEC ID N.º 12.
4. El anticuerpo monoclonal o un fragmento inmunológicamente eficaz del mismo según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento es un fragmento Fab o F(ab')₂.
- 15 5. El anticuerpo monoclonal o un fragmento inmunológicamente eficaz del mismo según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento es una cadena única.
6. Un compuesto polinucleotídico que comprende una secuencia codificante del anticuerpo o del fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 20 7. Una célula que es capaz de expresar el anticuerpo o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. Uso del anticuerpo monoclonal o del fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la fabricación de un medicamento destinado a tratar la enfermedad de Alzheimer clínica o preclínica.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 318 006 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly y Compañía
5 <120> Anticuerpos humanizados
<130> X14958
<150> 60/287539
<151> 30-04-2001
10 <160> 20
<170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 16
15 <212> PRT
<213> *Mus sp.*
20 <400> 1
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15
25 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus sp.*
30 <400> 2
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5
35 <210> 3
<211> 9
40 <212> PRT
<213> *Mus sp.*
<400> 3
45 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr
1 5
50 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus sp.*
55 <400> 4
Asn Tyr Gly Met Ser
1 5
60 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
65 <213> *Mus sp.*

ES 2 318 006 T3

<400> 5

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

5

Gly

10 <210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

15 <400> 6

Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr
 1 5 10

20 <210> 7

<211> 113

<212> PRT

25 <213> secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humanizado

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Asp o Tyr

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = Ser o Thr

40 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa = Ser o Thr

45 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

50 <223> Xaa = Leu, Ile o Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(50)

55 <223> Xaa = Arg o Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

60 <222> (88)..(88)

<223> Xaa = Val o Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

65 <222> (109)..(109)

<223> Xaa = Val o Leu

ES 2 318 006 T3

<400> 7

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

30 Arg

<210> 8

<211> 119

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> anticuerpo humanizado

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

45 <223> Xaa = Gln, Lys o Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (78)..(78)

50 <223> Xaa = Ser o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (87)..(87)

55 <223> Xaa = Arg o Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

60 <222> (88)..(88)

<223> Xaa = Ala, Ser o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

65 <222> (114)..(114)

<223> Xaa = Leu, Thr, Ile o Val

ES 2 318 006 T3

<400> 8

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

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

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

20 Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 50 55 60

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

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

35 Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

35 Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

40 <211> 113

<212> PRT

<213> secuencia artificial

45 <220>

<223> anticuerpo humanizado

50

55

60

65

ES 2 318 006 T3

<400> 9

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

35 Arg

<210> 10

<211> 119

40 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

45 <223> anticuerpo humanizado

50

55

60

65

ES 2 318 006 T3

<400> 10

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

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

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

20 Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 50 55 60

25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

35 Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

40 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

35 <210> 11

<211> 219

<212> PRT

<213> secuencia artificial

40 <220>

<223> anticuerpo humanizado

45

50

55

60

65

ES 2 318 006 T3

<400> 11

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

10 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

15 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

20 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

35 Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

40 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

45 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

50 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

55 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

60 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

65 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

70 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 12

<211> 449

<212> PRT

<213> secuencia artificial

65 <220>

<223> anticuerpo humanizado

ES 2 318 006 T3

<400> 12

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

ES 2 318 006 T3

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 5 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 10 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 15 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 20 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 25 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 30 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 300
 35 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 40 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 45 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345
 50 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 55 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 60 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 65 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 70 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 75 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 80 <210> 13
 <211> 46

ES 2 318 006 T3

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador de ADN

<400> 13

10 tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tggatgc 46

<210> 14

15 <211> 50

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador de ADN

<400> 14

25 tatagagctc aagcttccag tggatagach gatggggstg tygtttggc 50

<210> 15

30 <211> 1.953

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

35 <223> anticuerpo humanizado

<400> 15

40 acgcgtccac catgatgagt cctgcccagt tcctgtttct gttagtgctc tggattcggg 60
 aaaccaacgg tgatgtttgtg atgaccacagt ctccactctc cttgcctgtt accctgggac 120
45 aaccagcctc catctcttgc aagtcaagtc agagcctctt agatagtgat ggaaagacat 180
 atgtgaattg gttgcaacag cgcccaggcc agtctccaag acgcctaatac tatctggtgt 240

50

55

60

65

ES 2 318 006 T3

<400> 16

	acgcgtccac catgaacttc gggctcagct tgattttcct tgccttgtc ttaaaaggtg	60
5	tccagtgtga agtgcaactg gtggagtctg ggggaggcct agtgcagcct ggaggctctc	120
	tgaggctctc ctgtgcaggc tctggattca ctttcagtaa ctatggcatg tcttgggttc	180
	gccaggctcc tggaaagggg ctggagtggg ttgcatccat taggagtggg ggtggtagaa	240
10	cctactattc agacaatgta aagggccgat tcaccatctc cagagagaat gccaagaaca	300
	gcctgtacct gcaaatgaac agtctgagag ctgaggacac ggctgtctat tattgtgtca	360
15	gatatgatca ctatagtggg agctccgact actggggcca gggcaccttg gtcacagtct	420
	cctcaggtga gtcctcacia cctctagagc tttctggggc aggccaggcc tgacctggc	480
	tttggggcag ggagggggct aagggtgaggc aggtggcgcc agccagggtg acaccaatg	540
20	cccatgagcc cagacactgg acgctgaacc tcgctgacag ttaagaacct aggggctct	600
	gcgccctggg cccagctctg tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgagcc	660
	tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	720
25	acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg	780
	aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	840
	ctctactccc tcagcagcgt ggtgacctg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	900
30	atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tggtagaggg	960
	ccagcacagg gagggagggt gtctgtctgga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca	1020
	tcccggctat gcagccccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc tcttaccgg	1080
35	gaggcctctg cccgccccac tcatgctcag ggagagggtc ttctggcttt tccccaggc	1140
	tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag gggcagggtg	1200
40	tgggctcaga cctgccaaga gccatataccg ggaggaccct gccctgacc taagcccacc	1260
	ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacctt ctctcctccc agattccagt	1320
	aactccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgccacc	1380
45	gtgccagggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag	1440
	agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt	1500
	cctcagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtctcct cttccccca aaaccaagg	1560
50	acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg	1620

55

60

65

ES 2 318 006 T3

	aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga	1680
	caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc	1740
5	tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc	1800
	cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gacccgtggg gtgcgagggc	1860
	cacatggaca gaggccggct cggcccacc tctgccctga gagtgaccgc tgtaccaacc	1920
10	tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1980
	gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggca aaggcttcta tcccagcgac	2040
15	atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc	2100
	gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	2160
	tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac	2220
20	acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatgagtgc gacggccggc aagccccgc	2280
	tccccgggct ctcgcggtcg cacgaggatg cttggcacgt acccctgta catactccc	2340
	gggcgcccag catggaaata aagcaccag cgctgccctg ggcccctgcg agactgtgat	2400
25	ggttctttcc acgggtcagg ccgagtctga ggcctgagtg gcatgaggga ggcagagcgg	2460
	gtcccactgt cccacactg gcccaggctg tgcaggtgtg cctgggccgc ctagggtggg	2520
	gctcagccag gggctgccct cggcagggtg ggggatttgc cagcgtggcc ctcccctcag	2580
30	cagcacctgc cctgggctgg gccacgggaa gccctaggag cccctgggga cagacacaca	2640
	gcccctgcct ctgtaggaga ctgtcctggt ctgtgagcgc cctgtcctcc gacctccatg	2700
	cccactcggg ggcattgccta gtccatgtgc gtagggacag gccctccctc acccatctac	2760
35	ccccacggca ctaaccctg gctgccctgc ccagcctcgc acccgcattg ggacacaacc	2820
	gactccgggg acatgcactc tcgggccctg tggagggact ggtgcagatg cccacacaca	2880
40	cactcagccc agacccttc aacaaacccc gcaactgaggt tggccggcca cacggccacc	2940
	acacacacac gtgcacgctc cacacacgga gcctcaccg ggcgaactgc acagcaccca	3000
	gaccagagca aggtcctcgc acacgtgaac actcctcggga cacaggcccc cacgagcccc	3060
45	acgcggcacc tcaaggccca cgagcctctc ggcagcttct ccacatgctg acctgctcag	3120
	acaaaccag cctcctctc acaagggtgc ccctgcagcc gccacacaca cacaggggat	3180
	cacacaccac gtcacgtccc tggccctggc ccacttccca gtgccgccct tccctgcagg	3240
50	atcc	3244

<210> 17

55 <211> 717

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

60 <223> anticuerpo humanizado

65

ES 2 318 006 T3

<400> 17

```

5      atgatgagtc ctgcccagtt cctgtttctg ttagtgctct ggattcggga aaccaacggt      60
      gatgtttgta tgaccagtc tccactctcc ttgcctgtta ccctgggaca accagcctcc      120
      atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg      180
      ttgcaacagc gcccaggcca gtctccaaga cgcctaactt atctgggtgc taaactggac      240
10     tctggagtcc ctgacaggtt ctctggcagt ggatcagggg cagatctttac actgaaaatc      300
      agcagagtcg aggctgagga tgtgggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttcct      360
15     cggacgttcg gtggaggcac caagtgaggaa atcaaacgta ctgtggctgc accatctgtc      420
      ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcttg      480
      ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      540
20     tcgggtaact cccaggagag tgacacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
      agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctcgcgaa      660
      gtcaccatc agggcctgag ctgcctcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt      717

```

25

<210> 18

<211> 1.404

30 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humanizado

35

<400> 18

```

40     atgaacttcg ggctcagctt gatcttctt gtcttctt taaaagggtg ccagtgtgaa      60
      gtgcaactgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaggtctctt gaggtctctc      120
      tgtgcaggct ctggattcac tttcagtaac tatggcatgt cttgggttcg ccaggctcct      180
45     ggaaagggac tggagtgggt tgcattccatt aggagtgggt gtggtagaac ctactattca      240
      gacaatgtaa agggccgatt caccatctcc agagagaatg ccaagaacag cctgtacctg      300
      caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gctgtctatt attgtgtcag atatgatcac      360
50     tatagtggta gctccgacta ctggggccag ggcaccttgg tcacagtctc ctacagcctc      420
      accaagggcc catcgggtctt ccccctggca ccctctcca agagcacctc tgggggcaca      480

```

55

60

65

ES 2 318 006 T3

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
 tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
 5 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaactc 720
 tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
 10 gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccccggac ccctgaggtc 840
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
 15 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
 aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080
 20 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
 25 tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
 agcctctccc tgtctccggg taaa 1404

<210> 19

<211> 239

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> anticuerpo humanizado

<400> 19

45 Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 1 5 10 15

50 Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

55 Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg
 50 55 60

60

65

ES 2 318 006 T3

Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 5 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 10 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 15 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 20 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 25 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 30 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 35 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 40 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 20

<211> 468

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humanizado

<400> 20

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

ES 2 318 006 T3

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 5 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 10 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 15 Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
 65 70 75 80
 20 Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 25 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 30 Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
 115 120 125
 35 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140
 40 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 45 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 50 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 55 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 60 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220
 65 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 70 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 75 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

ES 2 318 006 T3

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

5 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

10 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315

15 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

20 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

25 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

30 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

35 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

40 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

45 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

50 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

55 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

60 Ser Pro Gly Lys
 465

65