

Radicación	14 115088 0011 0000	2015-12-23 00:19:01
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
Evento	378	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
Actuación	851	DIVISIONAL Folios: 3
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

Radicación	15 304917 0000 0000	2015-12-23 00:19:01
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
Evento	378	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
Actuación	411	PRESENTACION Folios: 3
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
Pago #1	138888	\$ 454100

Solicitud de División de Nuevas Creaciones

1 SOLICITANTE(S)

Nombre: BIOGEN IDEC INTERNATIONAL NEUROSCIENCE GMBH

Dirección: WAGISTRASSE 13 CH, 8952
Domicilio/País de constitución: SUIZA - ZURICH - SCHLIEREN

Nombre: UNIVERSITY OF ZURICH

Dirección: RAEMISTRASSE 71 CH 8006
Domicilio/País de constitución: SUIZA - ZURICH - ZURICH

2 APODERADO / REPRESENTANTE LEGAL ACTUAL

Nombre: CARLOS R. OLARTE GARCIA

Dirección: office@olartemoure.com
Domicilio/País de constitución: COLOMBIA - - BOGOTA D.C.

3 INVENTORES

Nombre: NITSCH ROGER

Dirección: LANGWISSTRASSE 27
Domicilio/País de constitución: SUIZA - ZURICH - ZUMIKON

Nombre: CHRISTOPH HOCK

Dirección: RIETSTRASSE 43 CH 8703
Domicilio/País de constitución: SUIZA - ZURICH - ERLNBACH

Nombre: MARIA GRAZIA BARENCO MONTRASIO

Dirección:	VOGELNESTSTR 7	Domicilio/País de constitución:	SUIZA - JURA - DELEMONT
Nombre:	FABIO MONTASIO		
Dirección:	VOGELNESTSTR 7	Domicilio/País de constitución:	SUIZA - ZURICH - SCHNEISINGEN
Nombre:	JAN GRIMM		
Dirección:	BURGLIST 16 CH 8600	Domicilio/País de constitución:	SUIZA - ZURICH - DUBENDORF
Nombre:	JEAN-LUC BAERISWYL		
Dirección:	BURGLISTRASSE 16	Domicilio/País de constitución:	SUIZA - ZURICH - ZURICH
Nombre:	PAUL WEINREB		
Dirección:	18 BRUNDRETT AVENUE	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - MINNESOTA - ANDOVER
Nombre:	JANAKY COOMARASWAMY		
Dirección:	ANWANDSTRASSE 45	Domicilio/País de constitución:	SUIZA - ZURICH - ZURICH
Nombre:	OMAR QUINTERO MOZON		
Dirección:	76 WASHINGTON AVENUE	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - NEW YORK - LATHAM
4	Representante Legal / Apoderado (Nuevo)		
Nombre:	CARLOS R. OLARTE GARCIA	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:	Cra. 5ta No. 34-03	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación:			

☒ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

79782747-

Presentación de Poder

Año de Radicación

Número de Radicación

5 Clasificación IPC

1 A61K 39/00

2 C7K 16/18

6 Prioridades

#	País	Número de prioridad	fecha de prioridad
1	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	61/553.113	2011-10-28

7 información PCT

Solicitud Internacional	Fecha Solicitud internacional	Publicación internacional	Fecha publicación Internacional
PCT/IB2012/002905	2012-10-26	WO2013/061163	2013-05-02

8 Datos de la solicitud de División

Expediente No:14 115088

Trámite:PCT-PATENTE DE INVENCION
CAPITULOS I Y II

Nombre actual de la creación: MOLÉCULA DE UNIÓN ESPECÍFICA A TDP-43

Requiere cambiar el nombre de la creación: NO

Gaceta Actual: 704

Publicación en Gaceta Actual: 972

9 Anexos

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones. Bajo la regla 4.17. (ii) del PCT.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros Anexos

CAPÍTULO REIVINDICATORIO

(Solicitud de Divisional B)

1. Un anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 aislado, o el fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde:

la región variable de cadena pesada comprende:

una CDR1 de VH de SEC ID NO: 260;

una CDR2 de VH de SEC ID NO: 261; y

una CDR3 de VH de SEC ID NO: 262;

y en donde la región variable de cadena ligera comprende:

una CDR1 de VL de SEC ID NO: 264;

una CDR2 de VL de SEC ID NO: 265; y

una CDR3 de VL de SEC ID NO: 266.

2. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 aislado o fragmento de unión a antígeno de la Reivindicación 1, en donde la región variable de cadena pesada comprende la SEC ID NO: 259 y la región variable de cadena ligera comprende la SEC ID NO: 263.

3. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 aislado o fragmento de unión a antígeno de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o anticuerpo murinizado.

4. Un fragmento de unión a antígeno aislado del anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 aislado de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.

5. El fragmento del anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 aislado de la Reivindicación 4, seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fv monocatenario (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂.

6. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 aislado o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno está unido a un fármaco.

7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 aislado o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6.

8. La composición farmacéutica de la Reivindicación 7, en donde la composición es una vacuna.
9. Una composición de diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 aislado o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, y que además comprende un reactivo de diagnóstico inmunobasado.
10. La composición de diagnóstico de la Reivindicación 9, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está unido a una marca detectable.
11. La composición de diagnóstico de la Reivindicación 10, en donde la marca detectable está seleccionada del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado.
12. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo anti-TDP-43 o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
13. El polinucleótido aislado de la Reivindicación 12, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 308 y/o SEQ ID NO: 309.
14. Un vector que comprende el polinucleótido de las Reivindicaciones 12 o 13.
15. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de las Reivindicaciones 12 o 13 o el vector de la Reivindicación 14.
16. Un método para preparar un anticuerpo anti-TDP-43 o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo, comprendiendo dicho procedimiento
 - (a) cultivar la célula de la Reivindicación 15; y
 - (b) aislar dicho anticuerpo o cadena(s) de inmunoglobulina de la misma del cultivo.
17. Un anticuerpo obtenido mediante el método de la Reivindicación 16.

MOLÉCULAS DE UNIÓN ESPECÍFICA A TDP-43

Campo de la invención

La invención se refiere en general a nuevas moléculas de
5 unión específica a TDP-43 (proteína de unión a ADN TAR de 43
kDa), tales como anticuerpos, incluyendo fragmentos,
derivados y variantes de estos, que reconocen específicamente
TDP-43. Además, la invención se refiere a composiciones
farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden dichos
10 anticuerpos y otras moléculas de unión específica a TDP-43 y
su uso para detectar e identificar TDP-43 en plasma, líquido
cefalorraquídeo, cerebro y otras muestras, así como en
aplicaciones terapéuticas incluyendo por ejemplo, estrategias
de vacunación pasiva para tratar trastornos relacionados con
15 agregados u otras aberraciones en la expresión de TDP-43,
tales como, degeneración del lóbulo frontotemporal y/o
esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer,
enfermedad de Parkinson y otras proteinopatías de TDP-43.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD) es la
segunda causa más común de demencia que afecta a individuos
de menos de 65 años de edad; véase, por ejemplo, McKhann *et*
al, Arch. Neurol. 58 (2001), 1803; Forman *et al.*, Ann.
Neurol. 59 (2006), 952 a 62. En un nivel patológico celular,

las lesiones características en la mayoría de los cerebros con FTLD son inclusiones de proteínas ubiquitinadas anómalas. La composición bioquímica de las inclusiones ubiquitinadas en la forma patológica más común de FTLD, concretamente FTLD-U, siguió siendo desconocida hasta 2006, cuando la proteína de unión a ADN-TAR 43 (TDP-43) se identificó como la principal proteína de enfermedad en la mayoría de los casos de FTLD-U esporádica y familiar. Posteriormente, también se descubrió que las inclusiones compactas ubiquitinadas, características de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) estaban compuestas de TDP-43, proporcionando de este modo pruebas de que ambas afecciones están ligadas mecánicamente y son parte del espectro de enfermedades que pueden clasificarse como proteinopatías de TDP-43, véase, por ejemplo, Neumann *et al.*, Science 314 (2006), 130 a 133.

Además de FTLD y ALS, también se sabe que TDP-43 se acumula en las células nerviosas y células gliales del complejo de demencia de Parkinson-ALS de Guam, degeneración corticobasal, Demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de neuronas motoras, demencia frontotemporal, degeneración del lóbulo frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina, esclerosis del hipocampo, miopatía de cuerpos de inclusión, miositis de cuerpos de inclusión, enfermedad de

Parkinson, demencia de enfermedad de Parkinson, complejo de demencia de Parkinson en península de Kii y enfermedad de Piek y similares; véase, por ejemplo, Lagier-Tourenne *et al*, Hum. Mol. Gen. 19 (2010), R46-64, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad. Estas enfermedades se denominan colectivamente proteinopatías de TDP-43. Se observa acumulación anómala de TDP-43 en el sitio de lesiones de cada enfermedad que parece implicar participación en la causa de degeneración nerviosa en estas enfermedades. Se ha propuesto que la localización citoplasmática aumentada de TDP-43 en cerebros y médulas espinales de pacientes denominada "preinclusiones" es un evento temprano en las proteinopatías de TDP-43, con la implicación de un posible papel patógeno en estas enfermedades; véase, por ejemplo Giordana *et al*, Brain Pathol. 20 (2010), 351 a 60. Coherentemente, se ha indicado que se ha encontrado localización de TDP-43 citoplasmática aumentada en estadios presintomáticos en ratones que sobreexpresan TDP-43 de tipo silvestre; véase por ejemplo, Wils *et al*, Proc. Natl Acad. Sci USA 107 (2010), 3858 a 63 así como en un modelo de rata agudo con expresión de TDP-43 de tipo silvestre mediada por adenovirus; véase, por ejemplo, Tatom *et al*, Mol. Ther. 17 (2009), 607 a 613. Se usan principalmente anticuerpos murinos monoclonales disponibles en el mercado en los estudios sobre

TDP-43 y para realizar diagnóstico patológico de proteinopatías de TDP-43. Un anticuerpo monoclonal murino anti TDP-43, que reconoce la forma fosforilada de TDP-43 se divulga en la Solicitud de Patente Europea N° 2 189 526 Al.

5 Se divulgan anticuerpos anti TDP-43 adicionales en Zhang *et al.*, Proc Nati Acad Sci U S A, 106(18): 7607 a 12 (2009) y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20100136573.

El éxito en la generación de anticuerpos monoclonales se
10 basa, entre otras cosas, en la fusión eficaz y selectiva de linfocitos B estimulados por antígenos con una línea celular de mieloma murino seguida de la selección de híbridos productores de anticuerpos estables como se ha descrito originalmente en Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495 a
15 497. Sin embargo, la utilidad terapéutica de anticuerpos de base murina en seres humanos está obstaculizada por la respuesta de anticuerpo humano anti ratón (HAMA) como consecuencia de su origen no humano. Se han puesto a disposición enfoques para preparar anticuerpos monoclonales
20 humanos o de tipo humano mediante ingeniería genética. Sin embargo, estos métodos típicamente padecen el inconveniente de que no son adecuados para producir anticuerpos que presenten muchas de las características de anticuerpos que se producen de forma endógena por el sistema inmunitario humano

durante el transcurso de una respuesta inmunitaria humana fisiológica. Además, estos anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden mostrar reactividad cruzada no deseada con otras proteínas y/o la proteína diana en el contexto de la conformación nativa biológicamente relevante y la función fisiológica normal del antígeno diana. Los efectos secundarios resultantes tras la administración sistémica de los anticuerpos exógenos pueden variar, por ejemplo, de enfermedad autoinmunitaria no deseada a reacciones anafilácticas. Estos efectos secundarios se han indicado en los llamados "anticuerpos humanizados", que originalmente surgen de organismos no humanos, tales como ratones, así como los llamados "anticuerpos completamente humanos", *in vitro* o en ratones xenogénicos modificados por ingeniería genética para expresar un repertorio de anticuerpos humanos. Por otro lado, la inmunización activa con antígenos patológicamente relevantes conlleva el riesgo considerable de que los pacientes desarrollen respuestas inmunitarias incontrolables contra estos antígenos y reactividad cruzada con antígenos endógenos que puede conducir en consecuencia a respuestas autoinmunitarias peligrosas.

Además, el desarrollo de ensayos para detectar y controlar los niveles de TDP-43 normal y patológica en plasma, líquido cefalorraquídeo y otras muestras como

biomarcadores de FTLT y ALS proporcionará la capacidad para diagnosticar y distinguir proteinopatías de TDP-43 de otros trastornos neurodegenerativos clínicamente similares, tales como tauopatías o proteinopatías relacionadas. Además, el desarrollo de ligandos de obtención de imágenes que permitan la detección y/o cuantificación de neuropatología de TDP-43 en pacientes vivos proporcionará una herramienta potente no solamente para el diagnóstico, sino también para el control de la respuesta de los pacientes que tengan una proteinopatía de TDP-43 neurodegenerativa a terapias modificadoras de enfermedad cuando estén disponibles.

Por lo tanto, existe la necesidad de superar las limitaciones anteriormente descritas y proporcionar anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico y otras moléculas de unión que reconozcan específicamente conformaciones biológicamente relevantes de TDP-43.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se refiere a moléculas de unión específica a TDP-43 (proteína de unión a ADN TAR de 43 kDa, tales como anticuerpos, incluyendo fragmentos, derivados y variantes de anticuerpos que son capaces de reconocer específicamente TDP-43. Por "reconocer específicamente TDP-43", "anticuerpo específico de/para TDP-43" y "anticuerpo anti TDP-43" se entiende específicamente, en general, y colectivamente,

anticuerpos para TDP-43, o TDP-43 plegada erróneamente, oligomérica, agregada o modificada postraduccionalmente. De acuerdo con una realización, los anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y derivados) reconocen específicamente TDP-43 de longitud completa, truncada o agregada humana. En una realización adicional, los anticuerpos reconocen TDP-43 humana de longitud completa que tiene la secuencia de SEC ID N°: 94 o un péptido que consiste en los restos 390 a 414 de la secuencia C terminal de SEC ID N°: 94 fosforilado en los restos 409 y 410.

En una realización, la molécula de unión específica a TDP-43 es un anticuerpo (incluyendo fragmentos de unión de antígeno o derivados de estos) que tienen una característica de unión inmunológica de un anticuerpo descrito en este documento, tal como un anticuerpo que tenga las regiones variables V_H y/o V_L de la secuencia de aminoácidos expuesta en (SEC ID N°: 1) y (SEC ID N°: 6), (SEC ID N°: 10) y (SEC ID N°: 14), (SEC ID N°: 18) y (SEC ID N°: 22), (SEC ID N°: 26) y (SEC ID N°: 31), (SEC ID N°: 35) y (SEC ID N°: 40), (SEC ID N°: 45) y (SEC ID N°: 49), (SEC ID N°: 53) y (SEC ID N°: 57), (SEC ID N°: 61) y (SEC ID N°: 65), (SEC ID N°: 69) y (SEC ID N°: 73), (SEC ID N°: 77) y (SEC ID N°: 82), (SEC ID N°: 87) y (SEC ID N°: 122), (SEC ID N°: 130) y (SEC ID N°: 134), (SEC

ID N°: 138) y (SEC ID N°: 142), (SEC ID N°: 146) y (SEC ID N°: 150), (SEC ID N°: 146) y (SEC ID N°: 151), (SEC ID N°: 155) y (SEC ID N°: 159), (SEC ID N°: 163) y (SEC ID N°: 167), (SEC ID N°: 171) y (SEC ID N°: 175), (SEC ID N°: 179) y (SEC ID N°: 183), (SEC ID N°: 187) y (SEC ID N°: 191), (SEC ID N°: 195) y (SEC ID N°: 199), (SEC ID N°: 203) y (SEC ID N°: 207), (SEC ID N°: 211) y (SEC ID N°: 215), (SEC ID N°: 219) y (SEC ID N°: 223), (SEC ID N°: 227) y (SEC ID N°: 213), (SEC ID N°: 235) y (SEC ID N°: 239), (SEC ID N°: 243) y (SEC ID N°: 247), (SEC ID N°: 251) y (SEC ID N°: 255), (SEC ID N°: 259) y (SEC ID N°: 263), o (SEC ID N°: 267) y (SEC ID N°: 271), respectivamente.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden un anticuerpo de la invención (incluyendo fragmentos del anticuerpo de unión a TDP-43 y derivados) o agonistas y moléculas afines de TDP-43, o como alternativa, antagonistas de estas y a métodos inmunoterapéuticos y de inmunodiagnóstico usando dichas composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de una proteinopatía de TDP-43, en el que se administra una cantidad eficaz de la composición a un paciente que lo necesite.

También están abarcados por la invención polinucleótidos que codifican moléculas de unión a TDP-43 tales como anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a

TDP-43 o variantes). En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención. En una realización adicional, el polinucleótido codifica al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una región variable de V_H y/o V_L como se representa en las Figuras 1 y 3. En una realización adicional, el polinucleótido codifica al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una región variable V_H y/o V_L codificada por una secuencia polinucleotídica como se expone en la Tabla 3. También están abarcados por la invención polinucleótidos que codifican derivados o análogos de los péptidos de unión a TDP-43 anteriormente codificados y los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos.

También están abarcados por la invención vectores que contienen polinucleótidos que codifican moléculas de unión a TDP-43 (por ejemplo, anticuerpos) de la invención y células hospedadoras transformadas con estos vectores y/o polinucleótidos, así como su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes que son específicas para TDP-43. Se conocen en la técnica medios y métodos para la producción recombinante de anticuerpos y otros polipéptidos de unión y miméticos de estos así como métodos para explorar con respecto a moléculas, por ejemplo,

anticuerpos, que compiten con estos anticuerpos u otras proteínas de unión por la unión con TDP-43. Como se describe en este documento, en algunas realizaciones, por ejemplo las relacionadas con aplicaciones terapéuticas en seres humanos, el anticuerpo de unión específica a TDP-43 de la invención es un anticuerpo humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo sustancialmente no tiene una respuesta HAMA observada de otro modo para anticuerpos quiméricos e incluso humanizados.

En una realización, la invención abarca moléculas que se unen específicamente con TDP-43 y el uso de estas moléculas para detectar la presencia de TDP-43 en una muestra. En consecuencia, las moléculas de unión a TDP-43 de la invención, tales como, anticuerpos anti TDP-43, pueden usarse para explorar sangre humana, CSF, y orina con respecto a la presencia de TDP-43 en las muestras, por ejemplo, usando ensayo basado en ELISA o adaptado a superficie. Los métodos y composiciones divulgados en este documento tienen aplicaciones en el diagnóstico de proteinopatías de TDP-43 tales como esclerosis lateral amiotrófica (ALS) o degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD). Los métodos y composiciones de la invención también tienen aplicaciones en el diagnóstico de enfermedad presintomática y en el control de la progresión de enfermedad y la eficacia terapéutica. De

acuerdo con algunas realizaciones, un anticuerpo específico para TDP-43 (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a TDP-43 o derivado de un anticuerpo) se pone en contacto con una muestra (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo o tejido cerebral) para detectar, 5 diagnosticar o controlar la degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD) o esclerosis lateral amiotrófica (ALS). En otra realización, se pone en contacto un anticuerpo específico para TDP-43 con una muestra para detectar, 10 diagnosticar o controlar una enfermedad seleccionada de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de cuerpos de Lewy. En otra realización, se pone en contacto un anticuerpo específico para TDP-43 con una muestra para detectar, diagnosticar o controlar una enfermedad 15 seleccionada de: enfermedad de granos argirófilos, complejo de demencia de ALS-Parkinson de Guam, degeneración corticobasal, Demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de neuronas motoras, degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD), demencia frontotemporal, 20 degeneración del lóbulo frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina, esclerosis del hipocampo, miopatía de cuerpos de inclusión, miositis de cuerpos de inclusión, demencia de enfermedad de Parkinson, complejo de demencia de Parkinson en península de Kii, enfermedad de Pick y

enfermedad o demencia de Machado-Joseph.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir una proteinopatía neurológica de TDP-43. De acuerdo con una realización, los métodos de la

5 invención comprenden administrar una concentración eficaz de un anticuerpo específico para TDP-43 (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a TDP-43 o derivado de un anticuerpo) a un sujeto. En una realización adicional, la invención proporciona un método

10 para tratar o prevenir proteinopatías neurológicas de TDP-43. De acuerdo con algunas realizaciones, se administra un anticuerpo específico para TDP-43 para tratar o prevenir la degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD) o esclerosis lateral amiotrófica (ALS). En otra realización, se administra

15 un anticuerpo específico para TDP-43 para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de cuerpos de Lewy. En otra realización, se administra un anticuerpo específico para TDP-43 para tratar o prevenir una enfermedad

20 seleccionada de enfermedad de granos argirófilos, complejo de demencia de ALS-Parkinson de Guam, degeneración corticobasal, Demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de neuronas motoras, degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD), demencia frontotemporal, degeneración

del lóbulo frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina, esclerosis del hipocampo, miopatía de cuerpos de inclusión, miositis de cuerpos de inclusión, demencia de enfermedad de Parkinson, complejo de demencia de Parkinson en
 5 península de Kii, enfermedad de Pick, y enfermedad o demencia de Machado-Joseph.

Son evidentes realizaciones adicionales de la invención a partir de la descripción y ejemplos siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 **Figuras 1A a 1K:** secuencias de aminoácidos de la región variable, es decir cadena pesada y cadena ligera kappa/lambda de anticuerpos humanos NI-205.3F10 (Fig. 1A), NI-205.51C1 (Fig. 1B), NI-205.21G2 (Fig. 1C), NI-205.8A2 (Fig. 1D), NI-205.15F12 (Fig. 1E), NI-205.113C4 (Fig. 1F), NI-205.25F3
 15 (Fig. 1G), NI-205.87E7 (Fig. 1H), NI-205.21G1 (Fig. 1I), NI-205.68G5 (Fig. 1J), y NI-205.20A1 (Fig. 1K). Se indican las regiones marco conservadas (FR), regiones determinantes de complementariedad (CDR; subrayadas), región de unión de cadena pesada (JH) y región de unión de cadena ligera (JK) o
 20 (JL). Las posiciones de aminoácidos modificadas para compensar artefactos de clonación inducidos por cebador de PCR potenciales y que se han modificado para coincidir con las secuencias de región variable de línea germinal humana correspondientes se proporcionan en negrita.

Figuras 2A a 2J: unión de anticuerpos de TDP-43 humanos con fragmentos marcados con His amino terminales de TDP-43 consistentes en los restos de aminoácidos 2 a 106 (dominio I (SEC ID N°: 117)), 99 a 204 (dominio II (SEC ID N°: 118)), 183 a 273 (dominio III (SEC ID N°: 119)), 258 a 414 (dominio IV (SEC ID N°: 120)), o 2 a 414 (longitud completa (SEC ID N°: 121)).

Figuras 3A a 3R: secuencias de aminoácidos de la región variable, es decir cadena pesada (VH) y cadena ligera kappa (VK)/lambda (VL) de anticuerpos humanos NI205.41D1 (Fig. 3A), NI205.29E11 (Fig. 3B), NI205.9E12 (Fig. 3C), NI205.98H6 (Fig. 3D), NI205.10D3 (Fig. 3E), NI205.44B2 (Fig. 3F), NI205.38H2 (Fig. 3G), NI205.36D5 (Fig. 3H), NI205.58E11 (Fig. 3I), NI205.14H5 (Fig. 3J), NI205.31D2 (Fig. 3K), NI205.8F8 (Fig. 3L), NI205.31C11 (Fig. 3M), NI205.8C10 (Fig. 3N), NI205.10H7 (Fig. 3O), NI205.1A9 (Fig. 3P), NI205.14W3 (Fig. 3Q) y NI205.19G5 (Fig. 3R). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están subrayadas.

Figuras 4A a 4H: determinación de la concentración eficaz semimáxima (CE₅₀) de anticuerpos de TDP-43 derivados de seres humanos por ELISA directo para (A a D) TDP-43 de longitud completa recombinante (●), extracto de *Escherichia coli* (▲) y BSA (■), o (E a H) un péptido sintético que abarca los restos 390 a 414 del dominio C terminal de TDP-43 con modificación

de fosforilación en los restos 409/410 (●) y BSA (■).

Figuras 5A a 5M: especificidad de unión de los anticuerpos derivados de seres humanos con dominios de TDP-43 que comprenden los aminoácidos 2 a 106 (dominio I), 99 a 204 (dominio II), 183 a 273 (dominio III), 258 a 414 (dominio IV) y 2 a 414 (longitud completa) de TDP-43 como se determina por ELISA directo.

Figuras 6A a 6Q: unión de anticuerpos derivados de seres humanos con dominios de TDP-43 que comprenden los aminoácidos 2 a 414 (longitud completa), 2 a 106 (dominio I), 99 a 204 (dominio II), 183 a 273 (dominio III), y 258 a 414 (dominio IV) de TDP-43 como se determina por Análisis de Transferencia de Western.

Figuras 7A a 7C: (A) unión del anticuerpo NI-205.41D1 con TDP-43 de longitud completa y fragmentos de TDP-43 que comprenden los restos de aminoácidos 258 a 414, 258 a 384, 258 a 375, 258 a 362, 258 a 353, 258 a 319, 317 a 414 y 340 a 414. (B) unión del anticuerpo NI-205.41D1 y 12892-1-AP con TDP-43 de longitud completa, fragmento de TDP-43 que comprende los restos de aminoácidos 258 a 414 y con un fragmento polipeptídico de TDP-43 mutante que comprende los restos de aminoácidos 258 a 414 y la sustitución A a G en el resto 321, la sustitución M a G en el resto 322 y la sustitución M a G en el resto 323 (TDP-43 258 a 414

AMM321GGG). (C) unión del anticuerpo NI-205.41D1 con fragmentos de TDP-43 que comprenden los restos de aminoácidos 316 a 353, 316 a 343, y 316 a 333.

Figuras 8A a 8C: purificación de formas monoméricas de TDP-43 usando condiciones caotrópicas suaves. A) gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie de formas de TDP-43 purificadas en presencia o ausencia del caótropo KSCN. Carriles 1 a 4, respectivamente: patrones de Peso Molecular, 6xHis-TDP-43 (1 a 414), 6xHis-SUMO-TDP-43 (1 a 414), 6His-SUMO-TDP-43 (220 a 414), todos purificados en presencia de KSCN 1,5 M, y carriles 5 y 6: 6xHis-SUMO-TDP-43 (101 a 265) purificado en presencia de KCl (carril 5) o KSCN (carril 6). B) Disposición de dominio de proteínas purificadas que ilustra la localización de dominios de unión a ARN (RRM1 y RRM2) así como marcadores (6His y SUMO). C) Distribuciones del coeficiente de sedimentación de ultracentrifugación analítica para TDP-43 de longitud completa marcado con 6His y 6His-SUMO purificado. Los coeficientes de sedimentación y pesos moleculares calculados se muestran por encima de los picos.

Figura 9: A) Unión de TDP-43 de longitud completa con ARN específico ((UG)₆) o de control ((UU)₆) en tampón que contiene HEPES 40 mM, KCl 0,5 M, arginina 0,4 M, pH 7,4. B), C) y D) unión de ARN por TDP-43 (101 a 265) en presencia de un tampón fisiológico que contiene HEPES 20 mM, glutamato potásico 80

mM, acetato magnésico 4 mM, glicerol 5 %, pH 7,5, DTT 2 mM, para determinar B) K_d , y la estequiometría purificada en C) condiciones no caotrópicas o D) condiciones caotrópicas suaves.

5 **Figura 10:** curvas de valoración para la unión del anticuerpo NI-205.41D1, NT-205.21G1, NI-205.51C1, NI-205.21G2 y NI-205.3F10 humano con A) TDP-43 de longitud completa plegado y B) fragmento de TDP-43 que comprende los restos 220 a 414 en un ensayo de ELISA de captura.

10 **Figura 11:** tinción inmunohistoquímica de tejido del hipocampo de FTLD-U humano con anticuerpos (A a C) 2E2-D3, (D a F) anticuerpo de control p403/p404, (G a I) anticuerpo de control p409/p410, (J) NI-205.10D3, (K) NI-205.8C10, (L) NI-205.15F12, (M) NI-205.8A2, (N) NI-205.3F10, (O) NI-205.21G2, 15 (P) NI-205.8F8, (Q) NI-205.31C11, (R) NI-205.36D5, (S) NI-205.31D2, (T) NI-205.10H7, (U) NI-205.14H5, (V) NI-205.68G5, (W) NI-205.14W3, (X) NI-205.21G1, y (Y) NI-205.41D1. (Z) tinción inmunohistoquímica de tejido del hipocampo de control con NI-205.41D1.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

Como se usa en este documento, la frase “enfermedades neurodegenerativas” se refiere a la presencia de acumulación de proteína, localización celular o plegamiento proteico

anómalo en el cerebro, médula espinal u otro tejido neural y están provocadas por la muerte o deterioro funcional de neuronas. En algunos casos de enfermedades neurodegenerativas, las anomalías definidas genéticamente contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen por ejemplo, enfermedad degenerativa cerebral (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva y enfermedad de Huntington) y enfermedades degenerativas de la médula espinal/enfermedades degenerativas de neuronas motoras, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica y atrofia muscular espinal; véase, por ejemplo, Forman *et al.* Nat. Med. 10 (2004), 1055 a 63.

“Proteinopatía de TDP-43” se refiere a enfermedades del sistema nervioso, en particular a enfermedades neurodegenerativas y se conoce como un grupo heterólogo de trastornos ligados por la proteína de unión a ADN TAR (sensible a Transactivación) de 43 kDa. Las proteínas de TDP-43 se caracterizan por el hecho de que TDP-43 es una proteína de enfermedad que liga mecánicamente la degeneración del lóbulo frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina (FTLD-U) con y sin enfermedad de neuronas motoras con la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de granos argirófilos, enfermedad de Alzheimer, esclerosis

lateral amiotrófica (ALS), complejo de demencia de Parkinson-ALS de Guam, degeneración corticobasal, Demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de neuronas motoras, degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD), demencia frontotemporal, degeneración del lóbulo frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina, esclerosis del hipocampo, miopatía de cuerpos de inclusión, miositis de cuerpos de inclusión, enfermedad de Parkinson, demencia de enfermedad de Parkinson, complejo de demencia de Parkinson en península de Kii, enfermedad de Pick, enfermedad de Machado-Joseph y similares; véase por ejemplo, Lagier-Tourenne *et al.*, Hum. Mol. Gen. 19 (2010), R46-64, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

En condiciones fisiológicas normales, TDP-43 se localiza predominantemente en el núcleo. Sin embargo, se observa una pérdida sustancial de TDP-43 nuclear en neuronas que portan inclusiones de TDP-43 citoplasmáticas aberrantes. TDP-43 muestra una identificación bioquímica específica de enfermedad; TDP-43 alterada patológicamente. Las proteinopatías de TDP-43 son distintas de la mayoría de otros trastornos neurodegenerativos en los que el plegamiento erróneo de la proteína conduce a amiloidosis cerebral, ya que TDP-43 patológica forma inclusiones neuronales y gliales que

carecen de las características de depósitos amiloides cerebrales; véase por ejemplo, Neumann *et al*, Arch Neurol. 64 (2007), 1388 a 1394, incorporado en este documento por referencia en su totalidad.

5 Como se usa en este documento, la expresión "TDP-43 patológica" se refiere a inclusiones extracelulares, citoplasmáticas, neuríticas y nucleares, también se denomina "cuerpo de inclusión de TDP-43" en el que la proteína forma grupos de tipo fibrilla. Específicamente, se ha descubierto
10 que la TDP-43 patológica está hiperfosforilada, ubiquitinada y truncada en el extremo N terminal, generando de este modo especies anómalas de TDP-43 que migran con una masa molecular superior a aproximadamente 45 kDa, así como una mancha de proteínas de alta masa molecular y fragmentos C terminales de
15 aproximadamente 25 kDa; véase, por ejemplo, Neumann *et al.*, Science 314 (2006), 130 a 133 y Arai *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 351 (2006), 602 a 611, cada una de las cuales se incorpora en este documento por referencia en su totalidad. Adicionalmente, se ha descubierto que TDP-43
20 muestra múltiples sitios de fosforilación en regiones carboxilo terminal de TDP-43 depositado y se ha sugerido que la fosforilación conduce a oligomerización y formación de fibrillas aumentadas de TDP-43; véase, por ejemplo, Hasegawa *et al.*, Annals of Neurology 64 (2008), 60 a 70.

La formación de cuerpos de inclusión de TDP-43 se ve acompañada de cambio en la distribución subcelular de TDP-43 con falta completa de tinción de TDP-43 nuclear difusa normal en células que portan inclusiones. La presencia y alcance de esta identificación patológica en materia gris y blanca cortical afectada, así como la médula espinal, se corresponde aproximadamente con la densidad de las inclusiones positivas para TDP-43; véase, por ejemplo, Neumann *et al.*, J. Neuropath. Exp, Neurol. 66 (2007), 177 a 183. La composición de las inclusiones ubiquitinadas (UBI) en FTLD-U se caracteriza por una abundancia relativa baja, distribución desigual de UBI entre diferentes casos de FTLD-U, y su naturaleza no amiloidogénica. Por lo tanto, TDP-43 es un marcador específico y sensible para detectar las lesiones inmunorreactivas a ubiquitina características en FTLD-U, incluyendo inclusiones citoplasmáticas neuronales (NCI), neuritas distróficas e inclusiones intranucleares neuronales (NII).

Como se usa en este documento, las expresiones "TARDBP", "proteína de unión a ADN sensible a transactivación de 43 kDa", "proteína de unión a ADN sensible a transactivo de 43 kDa", "proteína de unión a ADN-TAR de 43 kDa" y "TDP-43" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a la forma nativa de TDP-43. El término "TDP-43" también se usa para

hacer referencia colectivamente a todos los tipos y formas de TDP-43. "TDP-43" también se usa para identificar generalmente otros confórmers de TDP-43, incluyendo por ejemplo, formas fosforiladas de TDP-43 y agregados asociados con ubiquitina o
 5 agregados de TDP-43.

La secuencia de aminoácidos de TDP-43 humana se conoce en la técnica; véase, por ejemplo, Strausberg et al., proteína TARDBP (*Homo sapiens*) GenBank Pubmed: AAH71657 versión GI:47939520 incorporado en este documento por referencia en
 10 su totalidad. De acuerdo con una realización, la secuencia de aminoácidos de TDP-43 humana nativa es:

15 MSEYIRVTEDENDEPIEIPSEDDGTVLLSTVTAQFPGACGLRYRNPVSQCM
 RQVRLVEGILHAPDAGWGNLVYVVNYPKDNKRKMDETDASSAVKVKR
 AVQKTSDLIVLGLPWKTTEQDLKEYFSTFGEVLMVQVKDKLTGHSGKF
 GPVRFTEYETQVKVMSQRHMDGRWCDCKLPNSKQSQDEPLRSRKVFVG
 RCTEDMTEDELREFFSQYGDVMDVFIPKPFRAFAFVTFADDQIAQSLCGE
 DLIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGFGNSRGGG
 AGLGNNQGSNMGGMNFGAFSINPAMMAAAQAALQSSWGMMGMLAS
 QQNQSGPSGNNQNGNMOREPNQAFSGNNSYSGSNSGAAIGWGSASN
 AGSGSGFNCGFGSSMDSKSSGWGM (SEC ID N°: 94)

Como se usa en este documento, se entiende que el término "anticuerpo" o "anticuerpos" se refiere a anticuerpos completos, intactos, y Fab, Fab', F(ab)2 y otros fragmentos
 20 de anticuerpo. Los anticuerpos completos, intactos incluyen, a título enunciativo, anticuerpos monoclonales tales como anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados. Pueden producirse diversas formas de anticuerpos

usando técnicas de ADN recombinante convencionales (Winter y Milstein, *Nature* 349 (1991), 293 a 99. Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos "quiméricos", en los que el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo animal está unido a un dominio constante humano (un anticuerpo derivado inicialmente de un mamífero no humano en el que se ha usado tecnología de ADN recombinante para reemplazar todas o parte de las regiones bisagra y constante de la cadena pesada y/o la región constante de la cadena ligera, con regiones correspondientes de una cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina humana) (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567: Morrison *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984), 6851 a 6855). Los anticuerpos quiméricos reducen las respuestas inmunogénicas inducidas por anticuerpos animales cuando se usan en tratamientos clínicos humanos.

Además, pueden sintetizarse anticuerpos "humanizados" recombinantes. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos inicialmente derivados de un mamífero no humano en los que se ha usado tecnología de ADN recombinante para sustituir algunos o todos los aminoácidos no requeridos para la unión a antígeno con aminoácidos de regiones correspondientes de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana. Es decir, son quimeras que comprenden principalmente secuencias de

inmunoglobulina humana en las que se han insertado las regiones responsables de la unión a antígeno específica (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/04679). Los animales se inmunizan con el antígeno deseado, los anticuerpos correspondientes se aíslan y las partes de las secuencias de región variable responsables de la unión a antígeno específica se retiran. Las regiones de unión a antígeno derivadas de animales se clonan después en la posición apropiada de los genes de anticuerpo humano en los que se han suprimido las regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos humanizados minimizan el uso de secuencias heterólogas (entre especies) en anticuerpos para su uso en terapias humanas, y es menos probable que induzcan respuestas inmunitarias no deseadas. Pueden producirse de forma similar anticuerpos primatizados.

Realizaciones adicionales de la invención se refieren a anticuerpos humanos así como al uso de estos anticuerpos humanos. En una realización, los anticuerpos humanos derivan de linfocitos B humanos y otras células inmunitarias y generalmente se denominan en este documento "anticuerpos completamente humanos". Por lo tanto, la invención abarca el linfocito de memoria B humano inmortalizado y linfocito B, respectivamente, que produce el anticuerpo que tiene las características distintas y únicas que se definen

posteriormente. Como alternativa, los anticuerpos humanos pueden producirse en animales no humanos, tales como animales transgénicos que albergan uno o más transgenes de inmunoglobulina humana. Dichos animales pueden usarse como una fuente de esplenocitos para producir hibridomas, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.569.825.

Los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de la invención pueden ser un fragmento Fv monocatenario, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab), y un fragmento F(ab')₂. En realizaciones adicionales, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento de unión a TDP-43 que reconoce TDP-43 por uno o más dominios variables de anticuerpo, o fragmentos o variantes de estos, tales como una o más CDR o un derivado de una o más CDS. En una realización específica, posteriormente, el anticuerpo o fragmento de este es un anticuerpo de isotipo IgG humano. Como alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico humano-murino o murinizado, siendo este último particularmente útil para métodos de diagnóstico y estudios en animales.

También pueden usarse fragmentos de anticuerpo, anticuerpos univalentes y anticuerpos de un único dominio en los métodos y composiciones de la invención. Los anticuerpos univalentes comprenden un dímero de cadena pesada/cadena ligera unido con la región Fc (o tallo) de una segunda cadena

pesada. La "región Fab" se refiere a las partes de las cadenas que son aproximadamente equivalentes, o análogas, de las secuencias que comprenden las partes de la rama Y de la cadena pesada y de la cadena ligera en su totalidad, y que se ha mostrado colectivamente (en agregados) que muestran actividad de anticuerpos. Una proteína Fab incluye agregados de una cadena pesada y una ligera (habitualmente conocida como Fab'), así como tetrámeros que corresponden a los dos segmentos de ramas del anticuerpo Y (conocido habitualmente como F(ab)2), si cualquiera de los anteriores están agregados de forma covalente o no covalente, siempre que la agregación sea capaz de reaccionar específicamente con un antígeno o familia de antígenos particular.

Los anticuerpos de TDP-43 de la invención se unen específicamente con TDP-43, epítomos de TDP-43 y con diversas conformaciones de TDP-43 y epítomos de estos. Por ejemplo, se divulgan en este documento anticuerpos que se unen específicamente con TDP-43 nativa, TDP-43 de longitud completa y truncada y TDP-43 patológica. Como se usa en este documento, la referencia a un anticuerpo que "se une específicamente", "se une selectivamente" o "se une preferentemente" o aún más generalmente "se une a TDP-43" o "de unión a TDP-43", se refiere a un anticuerpo que se une con TDP-43 preferentemente sobre otras proteínas distintas.

Como se usa en este documento, un anticuerpo que “se une específicamente” o “se une selectivamente” con un confórmero de TDP-43 no se une con al menos otro confórmero de TDP-43. Por ejemplo, se divulgan en este documento anticuerpos que se
5 unen selectivamente con TDP-43 de longitud completa así como los que se unen selectivamente con TDP-43 citoplasmática sobre TDP-43 nuclear.

Debe observarse que el término “una” entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que “un
10 anticuerpo” representa uno o más anticuerpos. Como tales, las expresiones “un”, “uno o más” y “al menos uno” pueden usarse de forma intercambiable en este documento.

Como se usa en este documento, el término “polipéptido” se usa de forma intercambiable con el término “polipéptido” y
15 abarca un polipéptido/proteína singular así como polipéptidos/proteínas plurales y se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, “proteína”, “cadena
20 de aminoácidos” o cualquier otro término usado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de “polipéptido” y el término “polipéptido” se usa en lugar de, o de forma intercambiable con cualquiera de estos términos.

Como se usa en este documento, los términos “polipéptido” y “proteína” también se refieren a productos de modificaciones postexpresión del polipéptido, incluyendo a título enunciativo glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos de origen no natural u otros restos químicos. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente de una secuencia de ácido nucleico particular. Los polipéptidos de la invención pueden generarse de cualquier manera, incluyendo por síntesis química.

Un polipéptido de la invención puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente tienen dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida pueden denominarse en este documento plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que en su lugar adoptan un gran número de conformaciones diferentes, pueden denominarse en este documento desplegados. Como se usa en este documento, el término glucoproteína se refiere a un

polipéptido acoplado a al menos un resto de carbohidrato que está unido con la proteína mediante una cadena lateral que contiene oxígeno o una que contiene nitrógeno de un resto de aminoácido, por ejemplo, un resto de serina o un resto de asparagina.

Como se usa en este documento, un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado de este, se refiere a un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede estar retirado de su ambiente nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células hospedadoras pueden considerarse aislados para los fines de la invención, así como polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente por cualquier técnica adecuada.

También se incluyen como polipéptidos de la invención fragmentos, derivados, análogos o variantes de los polipéptidos anteriores, y cualquier combinación de estos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" cuando se hace referencia a anticuerpos o polipéptidos de unión a TDP-43 de la invención incluyen cualquier polipéptido que conserve al menos alguna de las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo de referencia correspondiente o

molécula de unión a TDP-43. Los fragmentos de polipéptidos de unión a TDP-43 tales como fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección, además de fragmentos de anticuerpo adicionales analizados en este documento. Variantes de molécula de unión a TDP-43, tales como anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno) y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones de aminoácidos, delecciones o inserciones. Las variantes pueden aparecer de forma natural o pueden ser de origen no natural. Pueden producirse variantes de origen no natural usando técnicas de mutagénesis conocidas en este campo. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Los derivados de moléculas de unión específica a TDP-43, por ejemplo, anticuerpos y otras moléculas de unión específica a TDP-43, son polipéptidos que se han alterado de modo que muestran características alteradas o adicionales no halladas en un polipéptido de referencia. Los ejemplos de derivados de moléculas de unión específica a TDP-43 incluyen proteínas de fusión. Los polipéptidos variantes también pueden denominarse en este documento "análogos polipeptídicos". Como se usa en este documento, un "derivado" de una molécula de unión

específica a TDP-43 o fragmento de esta, se refiere a un polipéptido objeto que tiene uno o más restos derivatizados químicamente por reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como “derivados” los péptidos que
5 contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo, de acuerdo con algunas realizaciones, 4-hidroxiprolina puede sustituir a prolina; 5-hidroxilisina puede sustituir a lisina; 3-metilhistidina puede sustituir a
10 histidina; homoserina puede sustituir a serina; u ornitina puede sustituir a lisina.

Como se usa en este documento, la expresión “polinucleótido” o “ácido nucleico” abarca un ácido nucleico singular así como ácidos nucleicos plurales, e incluye una
15 molécula o construcción de ácido nucleico aislado, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en ácidos péptido
20 nucleicos (PNA)).

La expresión “ácido polinucleotídico” también puede referirse a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido “aislado”

se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que se ha retirado de su ambiente nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un dominio variable de cadena pesada o ligera de anticuerpo contenido en un vector se considera aislado para los fines de la invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la invención incluyen además dichas moléculas producidas de forma sintética. Además, el polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión a ribosoma, o un terminador de la transcripción asociado operativamente con una secuencia que codifica un polipéptido de unión específica a TDP-43 de la invención.

Como se usa en este documento, un "región codificante" es una parte de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de parada" (TAG, TGA o TAA) no se traduce a un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, pero cualquier

secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores de la transcripción, intrones y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes de la invención pueden estar
5 presentes en una única construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones polinucleotídicas separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos
10 o más regiones codificantes, por ejemplo, un único vector puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector que incluye un ácido nucleico de la invención puede opcionalmente codificar
15 una o más regiones codificantes heterólogas, bien fusionadas o bien no fusionadas con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de unión a TDP-43, incluyendo por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento, variante o derivado de este. Las regiones codificantes heterólogas incluyen a título
20 enunciativo elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señal secretora o un dominio funcional heterólogo.

En ciertas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico de la invención es ADN. Un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido

opcionalmente incluye un promotor y/u otro elemento de control de la transcripción o traducción asociado operativamente con una o más regiones codificantes. Una asociación operativa está presente cuando una región

5 codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal modo que sitúe la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la secuencia o las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región

10 codificante de polipéptidos y un promotor asociado a esta) están "asociados operativamente" o "unidos operativamente" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si el enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere

15 con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o evitar la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Por lo tanto, una región promotora puede estar asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica un

20 polipéptido si el promotor es capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solamente en células predeterminadas. El promotor también puede ser constitutivo o regulable. Otros

elementos de control de la transcripción que están opcionalmente unidos operativamente con los ácidos nucleicos de la invención incluyen por ejemplo potenciadores, operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, pueden estar asociados operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de células. Se divulgan en este documento o se conocen de otro modo en la técnica ejemplos de promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción.

Se conocen en la técnica una diversidad de regiones de control de la transcripción que pueden usarse para controlar la expresión de los polinucleótidos de la invención. Estas incluyen, a título enunciativo, regiones de control de la transcripción que actúan en células de vertebrados, incluyendo a título enunciativo, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, junto con el intrón A), virus de simio 40 (el promotor temprano) y retrovirus (tales como virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen a título enunciativo, las derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovino y β globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la

transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores específicos de tejido y potenciadores así como promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

5 De forma similar, se conocen por los expertos habituales en la materia una diversidad de elementos de control de la traducción adecuados. Estos incluyen, a título enunciativo, sitios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción y elementos derivados de picornavirus
10 (particularmente un sitio de entrada de ribosoma interno, o IRES, también denominado secuencia CITE).

En otras realizaciones, un polinucleótido o ácido nucleico de la invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

15 Pueden asociarse secuencias codificantes de polinucleótidos y ácido nucleico de la invención con secuencias codificantes heterólogas adicionales que codifican por ejemplo péptidos secretores o señales, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido
20 de la invención. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretada que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena proteica creciente a través del retículo

endoplásmico rugoso. Los expertos habituales en la materia son conscientes de que los polipéptidos secretados por células de vertebrados generalmente tienen un péptido señal fusionado con el extremo N terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido de "longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En ciertas realizaciones, se usa el péptido señal nativo, por ejemplo, un péptido señal de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de la secuencia que conserva la capacidad para dirigir la secreción de un polipéptido con el que está unida operativamente. Como alternativa, puede usarse un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional de este. Por ejemplo, la secuencia del péptido señal nativo puede sustituirse con la secuencia del péptido señal del activador de plasminógeno tisular humano (TPA), β -glucuronidasa de ratón, o una secuencia señal derivada de una proteína secretada de una célula hospedadora preferida.

A no ser que se indique de otro modo, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de forma intercambiable en este documento.

Una "molécula de unión" como se usa en este documento se refiere principalmente a anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a TDP-43 o derivados), pero también

puede referirse a otras proteínas y polipéptidos que reconocen específicamente TDP-43 incluyendo, a título enunciativo, hormonas, receptores, ligandos, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), chaperonas tales como proteínas de choque térmico (HSP), y moléculas de adhesión célula-célula tales como miembros de las superfamilias de cadherina, integrina, lectina de tipo C e inmunoglobulina (Ig). También están abarcados por la invención fragmentos, variantes y derivados de estos polipéptidos que reconocen específicamente TDP-43. Para mayor claridad solamente y sin restringir el alcance de la invención la mayoría de las realizaciones siguientes se analizan con respecto a anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo y derivados) que representan una realización de las moléculas y composiciones de la invención que reconocen específicamente TDP-43.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de forma intercambiable en este documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión a TDP-43 que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Se entienden bien las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas de vertebrados; véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A*

Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988). Como se analizará en más detalle posteriormente, el término “inmunoglobulina” comprende diversas clases generales de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Como se entiende en general en la técnica, las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la “clase” del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional que puede incorporarse o modificarse en los anticuerpos de la invención para modificar propiedades funcionales u otras de estos anticuerpos. Las versiones modificadas de clases e isotipos de anticuerpos de la invención son fácilmente discernibles para un experto en la materia a la vista del informe y están dentro del alcance de la invención. Adicionalmente aunque todas las clases de inmunoglobulina están abarcadas por el alcance de la invención, para fines de brevedad y ejemplaridad, el siguiente análisis se dirige en general a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina convencional comprende dos

polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular de aproximadamente 23.000 Dalton, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular de 53.000 a 70.000 Dalton. Las cuatro cadenas típicamente se unen por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras flaquean las cadenas pesadas comenzando en la boca de la "Y" y continuando hasta la región variable.

Los polipéptidos de cadena ligera se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de polipéptido de cadena pesada puede unirse con una cadena ligera kappa o lambda. En general, los polipéptidos de cadena ligera y pesada se unen covalentemente entre sí, y las partes de "cola" de los dos polipéptidos de cadena pesada se unen entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, linfocitos B o células hospedadoras modificadas por ingeniería genética. En el polipéptido de cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van del extremo N terminal en los extremos en horquilla de la configuración en Y al extremo C terminal en la parte inferior de cada polipéptido de cadena pesada.

Los polipéptidos de cadena tanto ligera como pesada contienen regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de

regiones de cadena tanto ligera (V_L) como pesada (V_H) determinan el reconocimiento y la especificidad de antígenos. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH_1 , CH_2 o CH_3) confieren

5 propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión con el receptor de Fc , unión de complemento, y similares. Por convención la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se hacen más distantes del sitio de unión a

10 antígeno o el extremo amino terminal del anticuerpo. La parte N terminal de los polipéptidos de cadena pesada y ligera es una región variable y en la parte C terminal hay una región constante; los dominios CH_3 y CL comprenden de hecho el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada y ligera,

15 respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítomos en antígenos. Es decir, el dominio V_L y dominio V_H , o subconjunto de las regiones determinantes

20 de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternario forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada rama de la estructura en Y del anticuerpo. El

sitio de unión a antígeno de un anticuerpo completo se define por tres CDR en cada una de las cadenas V_H y V_L . Cualquier anticuerpo (incluyendo fragmentos de anticuerpo, derivados y variantes) que contenga suficiente estructura relacionada con inmunoglobulina para permitir que se una específicamente con TDP-43 se denomina de forma intercambiable en este documento "fragmento de unión" o "fragmento inmuno-específico", y puede denominarse generalmente anticuerpo que reconoce específicamente TDP-43.

En anticuerpos de origen natural, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables que se denominan con frecuencia "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno. Las CDR son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que forman el dominio de unión a antígeno ya que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un ambiente acuoso. Las "CDR" están flanqueadas por cuatro regiones "marco" relativamente conservadas o "FR" que muestran menos variabilidad de secuencia intermolecular que las CDR. Las regiones marco conservadas adoptan en gran medida una conformación en lámina β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Por lo tanto, las regiones marco conservadas actúan para formar un armazón que posibilita el posicionamiento de las CDR en orientación

correcta por interacciones intercatenarias, no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR de cadena pesada y ligera situadas colectivamente define una superficie complementaria del epítipo en el antígeno inmunorreactivo.

5 Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo con su epítipo afín. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco conservadas, respectivamente, pueden identificarse y definirse fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada
10 usando métodos conocidos en la técnica; véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" Kabat, E., *et al*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol Biol, 196 (1987), 901 a 917, que se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

15 En el caso de que haya dos o más definiciones de un término que se usen y/o acepten dentro de la técnica, la definición del término como se usa en este documento pretende incluir todos estos significados a no ser que se indique de forma explícita lo contrario. Un ejemplo específico es el uso
20 de la expresión "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación con antígeno no contiguos hallados dentro de la región variable de polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. Esta región particular se ha descrito por Kabat *et al*, U.S. Dept. of

Health, and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia y Lesk, J. Mol. Biol, 196 (1987), 901 a 917, que se incorporan en este documento por referencia en su totalidad, donde las

5 definiciones incluyen restos de aminoácidos solapantes o en subconjuntos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de una de las definiciones para hacer referencia a una CDR de un anticuerpo o variantes de este esté dentro del alcance del término CDR como se usa en

10 este documento. Los restos de aminoácidos apropiados que abarcan las CDR como se definen en cada una de las referencias anteriormente citadas se exponen en la Figura 1. El número de restos exacto que abarca una CDR particular variará dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Un

15 experto en la materia que cuenta con la secuencia de región variable de un anticuerpo puede determinar rutinariamente qué restos comprenden una región hipervariable particular o CDR de un anticuerpo IgG humano.

Tabla 1: Definiciones de CDR¹

20

	Kabat	Chothia
CDR1 VH	31 a 35	26 a 32
CDR2 VH	50 a 65	52 a 58
CDR3 VH	95 a 102	95 a 102
CDR1 VL	24 a 34	26 a 32
CDR2 VL	50 a 56	50 a 52
CDR3 VL	89 a 97	91 a 96

¹La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 2 es de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.*, (véase posteriormente).

Kabat *et al.*, también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar de modo inequívoco este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin basarse en ningún dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Como se usa en este documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto en Kabat *et al.*, U.S. Dept, of Health and Human. Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A no ser que se especifique de otro modo, las referencias a la numeración de posiciones de restos de aminoácidos específicas en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de estos de la invención son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, que, sin embargo, es teórico y puede no aplicarse igualmente a todos los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, dependiendo de la posición de la primera CDR (es decir, CDR1), las siguientes CDR podrían desplazarse en cualquier dirección.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. En realizaciones adicionales, un

anticuerpo de la invención no es un anticuerpo policlonal. De acuerdo con algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo bivalente, o multiespecífico. En otras realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo policlonal. En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención contienen anticuerpos monoclonales. En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención no contienen un anticuerpo policlonal.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo es humano (por ejemplo, un anticuerpo enteramente humano y/o completamente humano), humanizado, primatizado, murinizado o un anticuerpo quimérico. En realizaciones adicionales, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monocatenario, fragmento de unión a epítopo, por ejemplo, Fab, Fab' y $F(ab')_2$, Fd, Fv, Fv monocatenario (scFv), anticuerpo monocatenario, Fv unido a disulfuro (sdFv), un fragmento que comprende un dominio V_L o V_H , un fragmento producido por una biblioteca de expresión de Fab o un anticuerpo antiidiotípico (anti Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti Id para anticuerpos que contienen una secuencia de dominio variable proporcionada en la Figura 1, y otros anticuerpos divulgados en este documento). Se conocen en la técnica moléculas de scFv y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.892.019. Los anticuerpos de la invención pueden

ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, y IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2 IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención
5 son IgG1. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención son IgG3. En una realización adicional, el anticuerpo de la invención no es IgM o un derivado de este que contiene una estructura pentavalente. Más particularmente, en ciertas aplicaciones de la invención,
10 especialmente las que se refieren al uso terapéutico, los IgM son menos deseables que IgG y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de unión correspondientes dado que los IgM con frecuencia muestran reactividades cruzadas no específicas y afinidad muy baja como consecuencia de su estructura
15 pentavalente y falta de maduración de afinidad.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención no es un anticuerpo policlonal, es decir, consiste sustancialmente en una especie de anticuerpo particular en lugar de ser una mezcla obtenida de una muestra de
20 inmunoglobulina de plasma.

De acuerdo con una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal "completamente humano" que reconoce específicamente TDP-43 humana y que se aísla de un ser humano. En comparación con otros anticuerpos

monoclonales humanos, tales como los derivados de fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv) identificados usando una biblioteca de presentación de fagos o ratones xenogénicos, los anticuerpos monoclonales completamente humanos de la invención se caracterizan por (i) obtenerse usando la respuesta inmunitaria humana en lugar de sustitutos animales, es decir el anticuerpo se ha generado en respuesta a TDP-43 endógeno nativo en su conformación relevante en el cuerpo humano, (ii) haber protegido al individuo o ser al menos significativo con respecto a la presencia de TDP-43 y (iii) tener un riesgo reducido de autorreactividad frente a autoantígenos debido al hecho de que el anticuerpo es de origen humano.

Por lo tanto, aunque las expresiones “anticuerpo completamente humano” o “autoanticuerpo monoclonal humano” abarcan las expresiones “anticuerpo humano”, “anticuerpo monoclonal humano” y similares, estas expresiones se usan en este documento para indicar una molécula de unión a TDP-43 que es de origen humano, es decir que ha derivado de una célula productora de anticuerpos humanos tal como un linfocito B o hibridoma de este o una célula que contiene ácidos nucleicos tales como ADNc que es el ADNc del que se ha clonado directamente de o deriva de una célula productora de anticuerpos humanos tal como un linfocito B de memoria

humano. Un anticuerpo se considera "completamente humano" para los fines de este informe cuando el anticuerpo contiene una o más sustituciones de aminoácidos u otras alteraciones de un anticuerpo completamente humano, por ejemplo, para
5 mejorar las características de unión. Opcionalmente, las regiones marco conservadas del anticuerpo completamente humano u otros anticuerpos de la invención son o se han modificado para conformar una secuencia de región variable de línea germinal humana o para conformar una parte de una
10 secuencia de región variable de línea germinal humano, tal como una secuencia disponible, por ejemplo, en Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) hospedada en el Centro de Ingeniería Proteica MRC (Cambridge, Reino Unido). Dichas modificaciones pueden ser útiles, entre otros, para reducir o
15 eliminar las desviaciones de secuencia de línea germinal resultantes de los artefactos de clonación, tales como los que pueden resultar de cebadores de PCR.

Los anticuerpos derivados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o
20 más humanas se denominan generalmente en este documento anticuerpos humanos, o "anticuerpos de tipo humano". Dichas inmunoglobulinas no corresponden a inmunoglobulinas humanas endógenas, como se describe posteriormente. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.939.598. Por ejemplo,

el emparejamiento de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de tipo humano tales como anticuerpos sintéticos y semisintéticos típicamente aislados de presentación de fagos no reflejan necesariamente el emparejamiento original como
5 sucedió en el linfocito B humano original. En consecuencia, puede considerarse que los fragmentos Fab y scFv obtenidos de bibliotecas de expresión recombinante son artificiales y pueden presentar efectos de inmunogenicidad y estabilidad como resultado de su composición artificial. Por el
10 contrario, los anticuerpos completamente humanos de la invención son anticuerpos aislados, madurados por afinidad de sujetos humanos seleccionados y los anticuerpos se han caracterizado por su tolerancia en el hombre.

Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo
15 murinizado" o "inmunoglobulina murinizada" se refiere a un anticuerpo que comprende una o más CDR de un anticuerpo humano u otro anticuerpo de la invención; y por ejemplo una región marco conservada humana que contiene sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos que se basan en una
20 secuencia de anticuerpo de ratón. En este caso, la inmunoglobulina humana u otra que proporciona las CDR se denomina la "parental" o "aceptora" y el anticuerpo de ratón que proporciona los cambios de marco conservado se denomina el "donante". No es necesario que estén presentes regiones

constantes, pero si lo están, son habitualmente sustancialmente idénticas a las regiones constantes del anticuerpo de ratón, es decir al menos aproximadamente 85 a 90 %, o al menos aproximadamente 95 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % o más idénticas a la secuencia correspondiente de la región constante de ratón. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una inmunoglobulina de cadena pesada o ligera humana murinizada completa contiene una región constante de ratón, una o más CDR humanas, y un marco conservado sustancialmente humano que tiene varias sustituciones de aminoácidos "murinizantes". Típicamente, un "anticuerpo murinizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable murinizada y/o una cadena pesada variable murinizada. Por ejemplo, un anticuerpo murinizado no abarcaría un anticuerpo quimérico típico, por ejemplo, porque la región variable completa de un anticuerpo quimérico no es de ratón. Un anticuerpo modificado que se ha "murinizado" por el proceso de "murinización" se une con el mismo antígeno que el anticuerpo parental que proporciona las CDR y es habitualmente menos inmunogénico en ratones, en comparación con el anticuerpo parental.

Como se usa en este documento, la expresión "parte de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que

comprende una parte de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento de estos. Por ejemplo,

5 un polipéptido de unión de la invención puede comprender un polipéptido que contiene una región o regiones variables o partes de una región variable (por ejemplo, una o más CDR, tales como la CDR3 V_H), sola o en combinación con una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una

10 parte de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra, y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al

15 menos una parte de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una región o regiones variables o partes de una región variable (por ejemplo, una o más CDR, tales como CDR3 de V_H) y una cadena polipeptídica que comprende un

20 dominio CH3. En una realización adicional, un polipéptido de la invención carece de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Como se expone en este documento, y como se apreciaría por un experto habitual en la materia, los dominios polipeptídicos de cadena

pesada anteriores (por ejemplo, las partes de cadena pesada) pueden modificarse de tal modo que varíen en su secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina de origen natural. En consecuencia, la invención abarca polipéptidos
5 que comprenden fragmentos, variantes y derivados de las partes de cadena pesada de la invención.

De acuerdo con algunas realizaciones, las partes de cadena pesada de una cadena polipeptídica de un anticuerpo (incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes o
10 derivados de estos) son idénticas a las de una segunda cadena polipeptídica del anticuerpo. En realizaciones alternativas, las partes de cadena pesada de una cadena polipeptídica de un anticuerpo (incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de estos) son diferentes de la de una
15 segunda cadena polipeptídica del anticuerpo. Por lo tanto, cada componente monomérico de un anticuerpo de la invención puede comprender un sitio de unión a diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o diacuerpo.

20 Los fragmentos de anticuerpo de la invención, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender una región o regiones variables o partes de regiones variables (por ejemplo, una o más CDR, tales como CDR3 VH o CDR3 VL) solas o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente:

región bisagra, dominios CH1, CH2, y CH3. La invención abarca también fragmentos de unión a TDP-43 que comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos (incluyendo
5 fragmentos inmuno-específicos de estos) de la invención pueden derivar de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de llama, de caballo o de pollo. En
10 otra realización, la región variable puede ser de origen condictio (por ejemplo, de tiburones).

En otra realización, los anticuerpos divulgados en este documento están compuestos de una única cadena polipeptídica tal como scFv y van a expresarse de forma intracelular
15 (intracuerpos) para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vivo* potenciales.

Las partes de cadena pesada o partes de cadena ligera de un polipéptido de unión para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento divulgados en este documento pueden
20 derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una parte de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una

región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Como se usa en este documento, la expresión "parte de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. En una realización, la parte de cadena ligera comprende al menos un dominio V_L o CL .

10 Como se usa en este documento, la expresión "parte de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una parte de cadena ligera comprende al menos una región o regiones variables de cadena ligera o partes de una

15 región variable (por ejemplo, una o más CDR, tal como la CDR3 V_L). En algunas realizaciones, la parte de cadena ligera incluye un dominio $CH1$. En otra realización, la parte de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio V_L o CL . La invención también abarca polipéptidos que comprenden

20 fragmentos, variantes y derivados de estas partes de cadena ligera.

Se cree que el tamaño mínimo de un epítipo peptídico o polipeptídico para un anticuerpo es de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítomos peptídicos o polipeptídicos

pueden contener al menos siete, al menos nueve o entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, no es necesario que los aminoácidos que comprenden un epítipo sean contiguos, y en algunos casos pueden incluso no estar en la misma cadena peptídica. De acuerdo con una realización, un epítipo peptídico o polipeptídico reconocido por un anticuerpo de la invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 aminoácidos contiguos o no contiguos de TDP-43. En una realización adicional, un epítipo peptídico o polipeptídico reconocido por un anticuerpo de la invención contiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30, aproximadamente 10 y aproximadamente 30, o 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de TDP-43.

Las expresiones “que se une específicamente” y “que reconoce específicamente” se usan de forma intercambiable en este documento y se refieren en general a una molécula de unión (por ejemplo, un polipéptido tal como un anticuerpo) que se une con un epítipo o antígeno más fácilmente de lo que se uniría con un epítipo o antígeno no relacionado, aleatorio. Como se entiende en la técnica, un anticuerpo

puede unirse específicamente con, o reconocer específicamente un polipéptido aislado que comprende, o consiste en, restos de aminoácidos correspondientes a una parte lineal de un epítopo no contiguo. El término "especificidad" se usa en este documento para calificar la afinidad relativa por la que cierto anticuerpo se une con cierto epítopo o antígeno. Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo "A" tiene una especificidad mayor para un epítopo dado que el anticuerpo "B", o puede decirse que el anticuerpo "A" se une con el epítopo "C" con una especificidad mayor que la que tiene para el epítopo relacionado "D". Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo "A" tiene una especificidad mayor para un epítopo dado que el anticuerpo "B", o puede decirse que el anticuerpo "A" se une con el epítopo "C" con una especificidad mayor que la que tiene para el epítopo relacionado "D". De forma similar, puede considerarse que un anticuerpo "A" tiene una especificidad mayor para un antígeno dado que el anticuerpo "B", o puede decirse que el anticuerpo "A" se une con el antígeno "C" con una especificidad mayor que la que tiene para el antígeno relacionado "D".

Cuando está presente, la expresión "características de unión inmunológicas", u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas gramaticales, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada

u otras características de unión de un anticuerpo.

Por "que se une preferentemente", se entiende que la molécula de unión, por ejemplo, el anticuerpo se une específicamente con un epítipo o antígeno más fácilmente de lo que se uniría con un epítipo o antígeno relacionado, similar, homólogo o análogo. Por lo tanto, un anticuerpo que "se une preferentemente" con un epítipo o antígeno dado se uniría más probablemente con ese epítipo o antígeno que con un epítipo o antígeno relacionado, incluso aunque dicho anticuerpo pueda reaccionar de forma cruzada con el epítipo o antígeno relacionado.

Como ejemplo no limitante, puede considerarse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une con un primer epítipo o antígeno preferentemente si se une con dicho primer epítipo o antígeno con una constante de disociación (K_D) que es menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo o antígeno. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une con un primer antígeno preferentemente si se une con el primer epítipo o antígeno con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo o antígeno. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une con un primer epítipo o antígeno preferentemente si se une con el primer epítipo o antígeno

con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo o antígeno.

En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que una
5 molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, se une con un primer epítipo o antígeno preferentemente si se une con el primer epítipo o antígeno con una velocidad de disociación ($k(\text{off})$) que es menor que la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo o antígeno. En otro ejemplo no limitante,
10 puede considerarse que un anticuerpo se une con un primer epítipo o antígeno preferentemente si se une con el primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo o antígeno. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse
15 que un anticuerpo se une con un primer epítipo o antígeno preferentemente si se une con el primer epítipo o antígeno con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo o antígeno.

20 De acuerdo con una realización, una molécula de unión a TDP-43 (por ejemplo, un anticuerpo, incluyendo un fragmento de unión a antígeno o variante de un anticuerpo o derivado de estos) se une con TDP-43 o un fragmento o variante de este con una velocidad de disociación ($k(\text{off})$) inferior a o igual

a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-3} s^{-1} . En otra realización, una molécula de unión a TDP-43 se une con TDP-43 o un fragmento o variante de este, con una velocidad de disociación ($k(\text{off})$) inferior a o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-7} s^{-1} .

De acuerdo con otra realización, una molécula de unión a TDP-43 (por ejemplo, un anticuerpo, incluyendo un fragmento de unión a antígeno o variante de un anticuerpo o derivado de estos) se une con TDP-43 o un fragmento o variante de este, con una velocidad de asociación ($k(\text{on})$) superior a o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En una realización adicional, una molécula de unión a TDP-43 de la invención se une con TDP-43 o un fragmento o variante de este con una velocidad de asociación ($k(\text{on})$) superior a o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La invención también abarca una molécula de unión a TDP-43 que compite con una o más de las moléculas de unión a TDP-43 de la invención por la unión con TDP-43. Para los fines de esta invención, se dice que una molécula de unión a TDP-43 (por ejemplo, un anticuerpo) inhibe de forma competitiva la unión de una molécula de unión a TDP-43 de referencia (por ejemplo, anticuerpo) con un epítipo o antígeno dado si se une

preferentemente con ese epítopo o antígeno hasta el punto de que bloquea, en algún grado, la unión del anticuerpo de referencia con el epítopo o antígeno. La inhibición competitiva puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos de ELISA de competición. De acuerdo con una realización, una molécula de unión a TDP-43 (por ejemplo, un anticuerpo) inhibe competitivamente la unión de una molécula de unión a TDP-43 de referencia (por ejemplo, un anticuerpo) con un epítopo o antígeno dado en al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 % o al menos 50 %.

Como se usa en este documento, el término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítopo o antígeno individual con una molécula de unión a TDP-43 (por ejemplo, un anticuerpo, incluyendo fragmentos, variantes y derivados de este). Véase, por ejemplo, Harlow *et al*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. (1988) en las páginas 27 a 28. Como se usa en este documento, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno; véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29 a 34. La avidez se relaciona tanto con la afinidad de las moléculas

de inmunoglobulina individuales en la población con epítomos o antígenos específicos, como también con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítomo altamente repetitiva, tal como un polímero, sería de alta avidéz. La afinidad o avidéz de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions" en *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press Nueva York, N Y (1984), Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company Nueva York, N Y (1992), y métodos descritos en este documento. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno incluyen ELISA, RIA, y resonancia de plasmón superficial. La afinidad medida de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en condiciones diferentes, por ejemplo, concentración salina, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo, K_D , CI_{50} , se realizan preferentemente con soluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón normalizado.

También se describen moléculas de unión a TDP-43 (por ejemplo, anticuerpos incluyendo fragmentos de unión a

antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de estos) de la invención o se especifican con respecto a su reactividad cruzada. Como se usa en este documento, la expresión "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de una
5 molécula de unión a TDP-43 (por ejemplo, un anticuerpo) específica para un antígeno, para reaccionar con un segundo antígeno distinto; una medida que con frecuencia refleja el grado de relación entre dos sustancias antigénicas diferentes.

10 Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, porque se unen con epítomos o antígenos relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítomos con al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 65 %, al menos 60 %, al
15 menos 55 %, y al menos 50 % de identidad (como se calcula usando métodos descritos en este documento o conocidos de otro modo en la técnica) con un epítomo o antígeno de referencia. Puede considerarse que un anticuerpo es "altamente específico" para cierto epítomo, si no se une con
20 ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítomo o antígeno. De acuerdo con una realización las moléculas de unión a TDP-43 (por ejemplo, anticuerpos incluyendo fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, y variantes o derivados de estos) no se unen con epítomos con menos de 95

%, menos de 90 %, menos de 85 %, menos de 80 %, menos de 75 %, menos de 70 %, menos de 65 %, menos de 60 %, menos de 55 % y menos de 50 % identidad (como se calcula usando métodos descritos en este documento o conocidos de otro modo en la técnica) con un epítopo o antígeno de referencia en condiciones fisiológicas.

También se pueden describir moléculas de unión a TDP-43 tales como anticuerpos (incluyendo fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo y variantes o derivados de estos) de la invención con respecto a su afinidad de unión con TDP-43. De acuerdo con una realización las afinidades de unión de las moléculas de unión a TDP-43 (por ejemplo, anticuerpos incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de estos) incluyen las que tienen una constante de disociación o K_d inferior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

Las estructuras subunitarias y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina se conocen bien. Como se usa en este documento, la expresión "dominio V_H " incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de

inmunoglobulina y la expresión "dominio CH1" incluye el primer (más amino terminal) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio V_H y está en sentido amino terminal de la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se usa en este documento la expresión "dominio CH2" incluye la parte de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el resto 244 al resto 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (restos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y restos 231 a 340, sistema de numeración EU; véase Kabat EA et al., referencia ya citada). El dominio CH2 es único porque no se empareja estrechamente con otro dominio. En su lugar, se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificados ligados a N entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. También se ha documentado bien que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 al extremo C terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 restos.

Como se usa en este documento, la expresión "región bisagra" incluye la parte de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 con el dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible,

permitiendo de este modo que las dos regiones de unión a antígeno N terminal se muevan independientemente. Las regiones bisagras pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior; véase

5 Roux *et al*, J. Immunol. 161 (1998), 4083.

Como se usa en este documento la expresión “enlace disulfuro” incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un

10 segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG de origen natural, las regiones CH1 y CL están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o

15 229, el sistema de numeración EU).

Como se usa en este documento, los términos “unido”, “fusionado” o “fusión” se usan de forma intercambiable. Estos términos se refieren a la unión entre sí de dos o más elementos o componentes, por cualquier medio incluyendo

20 conjugación química o medios recombinantes. Una “fusión en fase” se refiere a la unión de dos o más fases abiertas de lectura polinucleotídicas (ORF) para formar una ORF continua más larga, de una manera que mantenga la fase de lectura de traducción correcta de las ORF originales. Por lo tanto, una

proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por las ORF originales (cuyos segmentos no están normalmente unidos de este modo en la naturaleza). Aunque la

5 fase de lectura se hace de este modo continua a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden separarse física o espacialmente mediante, por ejemplo, una secuencia enlazadora en fase. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de una región variable de inmunoglobulina

10 pueden fusionarse, en fase, pero separarse por un polinucleótido que codifica al menos una región marco conservada de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDR "fusionadas" se traduzcan conjuntamente como parte de un polipéptido continuo.

15 El término "expresión" como se usa en este documento se refiere a un proceso por el que un gen produce un producto bioquímico, por ejemplo, un ARN o polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, a título enunciativo,

20 anulación génica así como tanto expresión estable como expresión transitoria. Incluye a título enunciativo la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN en horquilla pequeño (ARNhp), ARN de interferencia pequeño (ARNip) o cualquier otro producto de

ARN, y la traducción de dicho ARNm en polipéptido o polipéptidos. Si el producto deseado final es un producto bioquímico, la expresión incluye la creación de ese producto bioquímico y cualquier precursor. La expresión de un gen
5 produce un "producto génico". Como se usa en este documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en este documento incluyen además
10 ácidos nucleicos con modificaciones postranscripcionales, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, por ejemplo, metilación, glucosilación, adición de lípidos, asociación con otras subunidades proteicas, escisión proteolítica y similares.

15 Como se usa en este documento, el término "muestra" se refiere a cualquier material biológico obtenido de un sujeto o paciente. En una realización, una muestra comprende sangre, líquido cefalorraquídeo ("CSF") u orina. En otra realización una muestra comprende sangre completa, plasma, linfocitos B
20 enriquecidos a partir de muestras sanguíneas, o células cultivadas (por ejemplo, linfocitos B de un sujeto). En otra realización una muestra de la invención contiene una biopsia o muestra tisular incluyendo tejido neural. En una realización adicional, una muestra de la invención comprende

células completas o un lisado de las células. Las muestras de la invención, incluyendo muestras de sangre y muestras de CSF pueden recogerse usando métodos conocidos en la técnica.

Como se usa en este documento, los términos “tratar” o
5 “tratamiento” se refieren al tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno, tal como el desarrollo de demencia. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, a
10 título enunciativo, alivio de los síntomas, reducción del alcance de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retardo o ralentización de la progresión de enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión (bien parcial o bien total), bien
15 detectable o bien indetectable. El “tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Las personas que necesitan tratamiento incluyen las que ya tienen la afección o trastorno así como las propensas a tener
20 la afección o trastorno o en las que la manifestación de la afección o trastorno debe prevenirse.

Por “sujeto”, “individuo”, “animal”, “paciente” o “mamífero” se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para el que

se desee el diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

II. Anticuerpos

La invención abarca anticuerpos que se unen selectivamente a TDP-43. Como se usa en este documento, el
5 término anticuerpo o anticuerpos abarcan anticuerpos completos, así como fragmentos de anticuerpo de unión a TDP-43 y variantes y derivados de estos anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo que se unen con TDP-43. En una
realización, un anticuerpo de la invención demuestra al menos
10 una, dos, tres, cuatro, cinco o más de las características estructurales (por ejemplo, secuencia), características de unión inmunológica (por ejemplo, CI_{50} , o unión a epítomos), y/o propiedades biológicas de los anticuerpos divulgados en los ejemplos y en otra parte en la memoria descriptiva.

15 De acuerdo con algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo completamente humano. La invención también abarca fragmentos, variantes y derivados de un anticuerpo completamente humano. Como se divulga en los ejemplos, los anticuerpos completamente humanos divulgados en
20 este documento derivaron de un grupo de muestras de sujetos sanos. Los anticuerpos de interés potencial se analizaron con respecto a determinación de clase y subclase de cadena ligera, se transcribió el mensaje de los cultivos de linfocitos B de memoria seleccionados por RT-PCR, se clonaron

y se combinaron en vectores de expresión para producción recombinante; véase los Ejemplos adjuntos. Los anticuerpos completamente humanos se expresaron después de forma recombinante en células HEK293 y se caracterizaron
5 posteriormente basándose en sus especificidades de unión hacia TDP-43 de longitud completa, TDP-43 truncada y una forma modificada de TDP-43 (Figuras 2, 4 a 7, 10 y 11). Esta caracterización confirmó que por primera vez se han clonado anticuerpos humanos que son altamente específicos para TDP-43
10 y reconocen diferentes epítomos dentro de la proteína TDP-43.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la invención se refiere en general a un anticuerpo que reconoce específicamente TDP-43. En una realización adicional, la invención se refiere a un anticuerpo humano que reconoce
15 específicamente TDP-43. En una realización adicional más, la invención se refiere a un anticuerpo humano total que reconoce específicamente TDP-43. En realizaciones adicionales, la invención abarca un fragmento de unión a TDP-43, variante o derivado de un anticuerpo humano intacto de
20 unión a TDP-43 (incluyendo completamente humano) de la invención. En otra realización, los anticuerpos de la invención reconocen específicamente TDP-43 de longitud completa, truncada o patológica humana en una transferencia de Western. En una realización adicional, los anticuerpos de

la invención se unen selectivamente a TDP-43 de longitud completa o patológica en una transferencia de Western. En otra realización, los anticuerpos de la invención reconocen específicamente TDP-43 de longitud completa, truncada o patológica humana en un ELISA. En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se unen selectivamente a TDP-43 de longitud completa o patológica en un ELISA. En otra realización, los anticuerpos de la invención reconocen específicamente cualquier combinación de TDP-43 de longitud completa, truncada o patológica humana en una inmunohistoquímica. En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se unen selectivamente a TDP-43 de longitud completa o patológica en una inmunohistoquímica. En otra realización, los anticuerpos de la invención reconocen específicamente cualquier combinación de TDP-43 de longitud completa, truncada o patológica humana en una inmunohistoquímica del hipocampo. En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se unen selectivamente a TDP-43 de longitud completa o patológica en una inmunohistoquímica del hipocampo. En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se unen selectivamente con uno o más de TDP-43 nuclear, TDP-43 citoplasmática, TDP-43 axónica o TDP-43 neurítica en una inmunohistoquímica del hipocampo con FTLD-U humano. En otra

realización, los anticuerpos de la invención se unen selectivamente con uno o más de TDP-43 citoplasmática y TDP-43 neurítica en células granulares del hipocampo en una inmunohistoquímica del hipocampo con FTL-D-U humano. De acuerdo con una realización, los anticuerpos de la invención reconocen específicamente TDP-43 humana patológica.

En otra realización la invención abarca un anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de este), que se une específicamente con el mismo epítipo de TDP-43 como un anticuerpo de referencia que tiene el dominio variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI-205.41D1, NI-205.29E11, NI-205.9E12, NI-205.98H6, NI-205.10D3, NI-205.44B2, NI-205.38H2, NI-205.36D5, NI-205.58E11, NI-205.14H5, NI-205.31D2, NI-205.8F8, NI-205.31C11, NI-205.8C10, NI-205.10H7, NI-205.1A9, NI-205.14W3 y NI-205.19G5. En una realización adicional, el anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de este), se une específicamente con el mismo epítipo de TDP-43 que un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-

205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1, NI205.29E11,
 NI205.9E12, NI205.98H6, NI205.10D3, NI205.44B2, NI205.38H2,
 NI205.36D5, NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31D2, NI205.8F8,
 NI205.31C11, NI205.8C10, NI205.10H7, NI205.1A9, NI205.14W3 y
 5 NI205.19G5.

En otra realización, la invención abarca un anticuerpo
 (incluyendo un fragmento de unión a antígeno, variante o
 derivados de este), que se une específicamente con una
 secuencia polipeptídica de TDP-43 seleccionada de:
 10 QYGDVMDVFIP (SEC ID N°: 123); AAIGWGSASNA (SEC ID N°: 124);
 DMTEDDELREFF (SEC ID N°: 125), EDENDEP (SEC ID N°: 126),
 VQVKKDL (SEC ID N°: 127), KEYFSTF (SEC ID N°: 128), IIKGISV
 (SEC ID N°: 315), NQSGPSG (SEC ID N°: 316), FNGGFGS (SEC ID
 N°: 317), FGNSRGGGAGL (SEC ID N°: 318), SNAGSGSGFNG (SEC ID
 15 N°: 319), QLERSGRFGGN (SEC ID N°: 320), EIPSEDD (SEC ID N°:
 321), FNGGFGSSMDS (SEC ID N°: 322) y
 SINPAMMAAAQAALQSSWGMMLASQ (SEC ID N°: 323). En otra
 realización, la invención abarca un anticuerpo (incluyendo un
 fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de este),
 20 que se une específicamente con los polipéptidos de TDP-43
 FGNSRGGGAGL (SEC ID N°: 318) y SNAGSGSGFNG (SEC ID N°: 319).
 En otra realización, la invención abarca un anticuerpo
 (incluyendo un fragmento de unión a antígeno, variante o
 derivados de este), que se une específicamente con el

polipéptido de TDP-43 SINPAMMAAAQAALQSSWGMMGMLASQ (SEC ID N°: 323), pero no se une específicamente con SINPGGGAAAQAALQSSWGMMGMLASQ (SEC ID N°: 314).

En una realización adicional, la invención abarca un anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de este), que inhibe de forma competitiva la unión con TDP-43 de un anticuerpo de referencia que tiene el dominio variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1, NI205.29E11, NI205.9E12, NI205.98H6, NI205.10D3, NI205.44B2, NI205.38H2, NI205.36D5, NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31D2, NI205.8F8, NI205.31C11, NI205.8C10, NI205.10H7, NI205.1A9, NI205.14W3 y NI205.19G5.

En una realización adicional, el anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno, variante o derivados de este), inhibe de forma competitiva la unión con TDP-43 de un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1 NI205.29E11, NI205.9E12, NI205.98H6, NI205.10D3, NI205.44B2, NI205.38H2,

NI205.36D5, NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31D2, NI205.8F8, NI205.31C11, NI205.8C10, NI205.10H7, NI205.1A9, NI205.14W3 y NI205.19G5.

Como se ilustra en los Ejemplos, la invención abarca anticuerpos que se unen con diferentes partes y epítomos de TDP-43. De acuerdo con algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención se une con un epítopo lineal de TDP-43. De acuerdo con otras realizaciones, un anticuerpo de la invención se une con un epítopo conformacional de TDP-43. En una realización adicional un anticuerpo de la invención se une selectivamente con un dominio de TDP-43 seleccionado del grupo que consiste en: dominio de TDP-43 I (restos de aminoácidos 2 a 106 de SEC ID N°: 94), dominio II de TDP-43 (restos de aminoácidos 99 a 204 de SEC ID N°: 94), dominio III de TDP-43 (restos de aminoácidos 183 a 273 de SEC ID N°: 94) y dominio IV de TDP-43 (restos de aminoácidos 258 a 414 de SEC ID N°: 94). En otra realización, el anticuerpo anti TDP-43 no reconoce una forma truncada de TDP-43. En una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti TDP-43 que reconoce un fragmento N terminal₁ a 259 de TDP-43. En una realización adicional, el anticuerpo anti TDP-43 se une selectivamente con TDP-43 patológica. En una realización adicional, un anticuerpo anti TDP-43 se une específicamente con el dominio IV de TDP-43 (restos de

aminoácidos 258 a 414 de SEC ID N°: 94), pero no se une específicamente con el dominio IV de TDP-43 que comprende las sustituciones A321G, M322G y M323G.

La invención abarca anticuerpos anti TDP-43 humanos que tienen diferentes especificidades de TDP-43, que son por lo tanto particularmente útiles para fines de diagnóstico y terapéuticos. La invención también se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la presente en un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1, NI205.29E11, NI205.9E12, NI205.98H6, NI205.10D3, NI205.44B2, NI205.38H2, NI205.36D5, NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31D2, NI205.8F8, NI205.31C11, NI205.8C10, NI205.10H7, NI205.1A9, NI205.14W3, y NI205.19G5.

Los ejemplos y Figuras divulgan moléculas de unión a TDP-43 que se caracterizan por contener en su dominio de unión al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la región variable V_H y/o V_L que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas en las Figuras 1A a 1K y 3A a 3R y enumeradas en la Tabla 2. Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican estas regiones

variables se exponen en la Tabla 3. Un conjunto ejemplar de CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región VH y/o VL se representa en las Figuras 1A a 1K y 3A a 3R. Sin embargo, como se entendería por un experto habitual en la materia, pueden usarse CDR adicionales o alternativas, que se unen específicamente con TDP-43 pero que difieren en su secuencia de aminoácidos de las expuestas en las Figuras 1A a 1K y 3A a 3R en uno, dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

10

15

20

Tabla 2. SEC ID N° de la región V_H, CDR1 V_H, CDR2 V_H, CDR2 V_H,
región V_L, CDR2 V_L, CDR2 V_L y CDR3 V_L de anticuerpos
específicos de TDP-43.

5	Anticuerpo	V _H /V _L	CDR1	CDR2	CDR3
	NI-205.3F10	V _H	SEC ID N°: 1	SEC ID N°: 3	SEC ID N°: 4
		V _L	SEC ID N°: 6	SEC ID N°: 7	SEC ID N°: 8
	NI-205.51C1	V _H	SEC ID N°: 10	SEC ID N°: 11	SEC ID N°: 12
		V _L	SEC ID N°: 14	SEC ID N°: 15	SEC ID N°: 16
	NI-205.21G2	V _H	SEC ID N°: 18	SEC ID N°: 19	SEC ID N°: 20
		V _L	SEC ID N°: 22	SEC ID N°: 23	SEC ID N°: 24
10	NI-205.8A2	V _H	SEC ID N°: 26	SEC ID N°: 28	SEC ID N°: 29
		V _L	SEC ID N°: 31	SEC ID N°: 32	SEC ID N°: 33
	NI-205.15F12	V _H	SEC ID N°: 35	SEC ID N°: 37	SEC ID N°: 38
		V _L	SEC ID N°: 40	SEC ID N°: 42	SEC ID N°: 43
	NI-205.113C4	V _H	SEC ID N°: 45	SEC ID N°: 46	SEC ID N°: 47
		V _L	SEC ID N°: 49	SEC ID N°: 50	SEC ID N°: 51
15	NI-205.25F3	V _H	SEC ID N°: 53	SEC ID N°: 54	SEC ID N°: 55
		V _L	SEC ID N°: 57	SEC ID N°: 58	SEC ID N°: 59
	NI-205.87E7	V _H	SEC ID N°: 61	SEC ID N°: 62	SEC ID N°: 63
		V _L	SEC ID N°: 65	SEC ID N°: 66	SEC ID N°: 67
	NI-205.21G1	V _H	SEC ID N°: 69	SEC ID N°: 70	SEC ID N°: 71
		V _L	SEC ID N°: 73	SEC ID N°: 74	SEC ID N°: 75
	NI-205.68G5	V _H	SEC ID N°: 77	SEC ID N°: 79	SEC ID N°: 80
		V _L	SEC ID N°: 82	SEC ID N°: 84	SEC ID N°: 85
20	NI-205.20A1	V _H	SEC ID N°: 87	SEC ID N°: 88	SEC ID N°: 89
		V _L	SEC ID N°: 122	SEC ID N°: 91	SEC ID N°: 92
	NI205.41D1	V _H	SEC ID N°: 130	SEC ID N°: 131	SEC ID N°: 132
		V _L	SEC ID N°: 134	SEC ID N°: 135	SEC ID N°: 136
	NI205.29E11	V _H	SEC ID N°: 138	SEC ID N°: 139	SEC ID N°: 140

5

10

15

20

Anticuerpo	V _H /V _L	CDR1	CDR2	CDR3
	V _L SEC ID N°: 142	SEC ID N°: 143	SEC ID N°: 144	SEC ID N°: 145
NI205.9E12	V _H SEC ID N°: 146	SEC ID N°: 147	SEC ID N°: 148	SEC ID N°: 149
	V _L SEC ID N°: 150	SEC ID N°: 326	SEC ID N°: 327	SEC ID N°: 328
	V _L SEC ID N°: 151	SEC ID N°: 152	SEC ID N°: 153	SEC ID N°: 154
NI205.98H6	V _H SEC ID N°: 155	SEC ID N°: 156	SEC ID N°: 157	SEC ID N°: 158
	V _L SEC ID N°: 159	SEC ID N°: 160	SEC ID N°: 161	SEC ID N°: 162
NI205.10D3	V _H SEC ID N°: 163	SEC ID N°: 164	SEC ID N°: 165	SEC ID N°: 166
	V _L SEC ID N°: 167	SEC ID N°: 168	SEC ID N°: 169	SEC ID N°: 170
NI205.44B22	V _H SEC ID N°: 171	SEC ID N°: 172	SEC ID N°: 173	SEC ID N°: 174
	V _L SEC ID N°: 175	SEC ID N°: 176	SEC ID N°: 177	SEC ID N°: 178
NI205.38H2	V _H SEC ID N°: 179	SEC ID N°: 180	SEC ID N°: 181	SEC ID N°: 182
	V _L SEC ID N°: 183	SEC ID N°: 184	SEC ID N°: 185	SEC ID N°: 186
NI205.36D5	V _H SEC ID N°: 187	SEC ID N°: 188	SEC ID N°: 189	SEC ID N°: 190
	V _L SEC ID N°: 191	SEC ID N°: 192	SEC ID N°: 193	SEC ID N°: 194
NI205.58E11	V _H SEC ID N°: 195	SEC ID N°: 196	SEC ID N°: 197	SEC ID N°: 198
	V _L SEC ID N°: 199	SEC ID N°: 200	SEC ID N°: 201	SEC ID N°: 202
NI205.14H5	V _H SEC ID N°: 203	SEC ID N°: 204	SEC ID N°: 205	SEC ID N°: 206
	V _L SEC ID N°: 207	SEC ID N°: 208	SEC ID N°: 209	SEC ID N°: 210
NI205.31D2	V _H SEC ID N°: 211	SEC ID N°: 212	SEC ID N°: 213	SEC ID N°: 214
	V _L SEC ID N°: 215	SEC ID N°: 216	SEC ID N°: 217	SEC ID N°: 218
NI205.8F8	V _H SEC ID N°: 219	SEC ID N°: 220	SEC ID N°: 221	SEC ID N°: 222
	V _L SEC ID N°: 223	SEC ID N°: 224	SEC ID N°: 225	SEC ID N°: 226
NI205.31C11	V _H SEC ID N°: 227	SEC ID N°: 228	SEC ID N°: 229	SEC ID N°: 230
	V _L SEC ID N°: 231	SEC ID N°: 232	SEC ID N°: 233	SEC ID N°: 234
NI205.8C10	V _H SEC ID N°: 235	SEC ID N°: 236	SEC ID N°: 237	SEC ID N°: 238
	V _L SEC ID N°: 239	SEC ID N°: 240	SEC ID N°: 241	SEC ID N°: 242
NI205.10H7	V _H SEC ID N°: 243	SEC ID N°: 244	SEC ID N°: 245	SEC ID N°: 246
	V _L SEC ID N°: 247	SEC ID N°: 248	SEC ID N°: 249	SEC ID N°: 250
NI205.1A9	V _H SEC ID N°: 251	SEC ID N°: 252	SEC ID N°: 253	SEC ID N°: 254

5

Anticuerpo	V _H /V _L	CDR1	CDR2	CDR3
NI205.14W3	V _L	SEC ID N°: 255	SEC ID N°: 256	SEC ID N°: 257
	V _H	SEC ID N°: 259	SEC ID N°: 260	SEC ID N°: 261
	V _L	SEC ID N°: 263	SEC ID N°: 264	SEC ID N°: 265
NI205.19G5	V _H	SEC ID N°: 267	SEC ID N°: 268	SEC ID N°: 269
	V _L	SEC ID N°: 271	SEC ID N°: 272	SEC ID N°: 273

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende al menos una CDR que comprende, o consiste en una

10 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 3 a 5, 7 a 9, 11 a 13, 15 a 17, 19 a 21, 23 a 25, 28 a 30, 32 a 34, 37 a 39, 42 a 44, 46 a 48, 50 a 52, 54 a 56, 58 a 60, 62 a 64, 66 a 68, 70 a 72, 74 a 76, 79 a 81, 84 a 86, 88 a 93, 131 a 133, 135 a 137, 139 a 141, 143 a 145,

15 147 a 149, 152 a 154, 156 a 158, 160 a 162, 164 a 166, 168 a 170, 172 a 174, 176 a 178, 180 a 182, 184 a 186, 188 a 190, 192 a 194, 196 a 198, 200 a 202, 204 a 206, 208 a 210, 212 a 214, 216 a 218, 220 a 222, 224 a 226, 228 a 230, 232 a 234, 236 a 238, 240 a 242, 244 a 246, 248 a 250, 252 a 254, 256 a

20 258, 260 a 262, 264 a 266, 268 a 270, 272 a 274 y 326 a 328.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que comprenden, o consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 3 a 5, 7 a

9, 11 a 13, 15 a 17, 19 a 21, 23 a 25, 28 a 30, 32 a 34, 37 a 39, 42 a 44, 46 a 48, 50 a 52, 54 a 56, 58 a 60, 62 a 64, 66 a 68, 70 a 72, 74 a 76, 79 a 81, 84 a 86, 88 a 93, 131 a 133, 135 a 137, 139 a 141, 143 a 145, 147 a 149, 152 a 154, 156 a 158, 160 a 162, 164 a 166, 168 a 170, 172 a 174, 176 a 178, 180 a 182, 184 a 186, 188 a 190, 192 a 194, 196 a 198, 200 a 202, 204 a 206, 208 a 210, 212 a 214, 216 a 218, 220 a 222, 224 a 226, 228 a 230, 232 a 234, 236 a 238, 240 a 242, 244 a 246, 248 a 250, 252 a 254, 256 a 258, 260 a 262, 264 a 266, 268 a 270, 272 a 274 y 326 a 328.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que comprenden, o consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 3 a 5 y 7 a 9, 11 a 13 y 15 a 17, 19 a 21 y 23 a 25, 28 a 30 y 32 a 34, 37 a 39 y 42 a 44, 46 a 48 y 50 a 52, 54 a 56 y 58 a 60, 62 a 64 y 66 a 68, 70 a 72 y 74 a 76, 79 a 81 y 84 a 86, 88 a 93, 131 a 133 y 135 a 137, 139 a 141 y 143 a 145, 147 a 149 y 152 a 154, 156 a 158 y 160 a 162, 164 a 166 y 168 a 170, 172 a 174 y 176 a 178, 180 a 182 y 184 a 186, 188 a 190 y 192 a 194, 196 a 198 y 200 a 202, 204 a 206 y 208 a 210, 212 a 214 y 216 a 218, 220 a 222 y 224 a 226, 228 a 230 y 232 a 234, 236 a 238 y 240 a 242, 244 a 246 y 248 a 250, 252 a 254 y 256 a 258, 260 a 262 y 264 a 266, 268 a 270 y 272 a 274, y 147 a

149 y 326 a 328.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una, dos o tres CDR VH que comprenden, o consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
5 consiste en SEC ID N°: 3 a 5, 11 a 13, 19 a 21, 28 a 30, 37 a 39, 46 a 48, 54 a 56, 62 a 64, 70 a 72, 79 a 81, 88 a 90, 131 a 133, 139 a 141, 147 a 149, 156 a 158, 164 a 166, 172 a 174, 180 a 182, 188 a 190, 196 a 198, 204 a 206, 212 a 214, 220 a 222, 228 a 230, 236 a 238, 244 a 246, 252 a 254, 260 a 262 y
10 268 a 270.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una, dos o tres CDR VL que comprenden, o consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
15 consiste en SEC ID N°: 7 a 9, 15 a 17, 23 a 25, 32 a 34, 42 a 44, 50 a 52, 58 a 60, 66 a 68, 74 a 76, 84 a 86, 91 a 93, 135 a 137, 143 a 145, 152 a 154, 160 a 162, 168 a 170, 176 a 178, 184 a 186, 192 a 194, 200 a 202, 208 a 210, 216 a 218, 224 a 226, 232 a 234, 240 a 242, 248 a 250, 256 a 258, 264 a 266, 272 a 274 y 326 a 328.

20 De acuerdo con una realización, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 3, 11, 19, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 131, 139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260 o 268; una CDR2

VH de SEC ID N°: 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205, 213, 221, 229, 237, 245, 253, 261 o 269; o una CDR3 VH de SEC ID N°: 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133, 141, 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262 o 270. De acuerdo con otra realización, un anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135, 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326; una CDR2 VL de SEC ID N°: 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327; o una CDR3 VL de SEC ID N°: 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 3, 11, 19, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 131, 139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260 o 268; una CDR2 VH de SEC ID N°: 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205, 213, 221, 229, 237, 245, 253, 261 o 269; o una CDR3 VH de SEC ID N°: 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133, 141, 149, 158, 166, 174, 182, 190,

198, 206, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262 o 270, y comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135, 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 5 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326; una CDR2 VL de SEC ID N°: 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327; o una CDR3 VL de SEC ID N°: 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 10 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328.

De acuerdo con una realización, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 3, 11, 19, 28, 37, 46, 15 54, 62, 70, 79, 88, 131, 139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260 o 268; una CDR2 VH de SEC ID N°: 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205, 213, 221, 229, 237, 245, 253, 261 o 269; y una CDR3 VH de SEC ID N°: 5, 20 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133, 141, 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262 o 270. De acuerdo con otra realización, un anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74,

84, 91, 135, 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326; una CDR2 VL de SEC ID N°: 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327; y una CDR3 VL de SEC ID N°: 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 3, 11, 19, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 131, 139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260 o 268; una CDR2 VH de SEC ID N°: 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205, 213, 221, 229, 237, 245, 253, 261 o 269; una CDR3 VH de SEC ID N°: 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133, 141, 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262 o 270, y comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR VL de SEC ID N°: 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135, 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326: una CDR2 VL de SEC ID N°: 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327; y una CDR3 VL de SEC ID

Nº: 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID Nº: 3, una CDR2 VH de SEC ID Nº: 4 y CDR3 VH de SEC ID Nº: 5, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID Nº: 7, una CDR2 VL de SEC ID Nº: 8 y una CDR3 VL de SEC ID Nº: 9.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID Nº: 11, una CDR2 VH de SEC ID Nº: 12 y CDR3 VH de SEC ID Nº: 13, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID Nº: 15, una CDR2 VL de SEC ID Nº: 16 y una CDR3 VL de SEC ID Nº: 17.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID Nº: 19, una CDR2 VH de SEC ID Nº: 20 y CDR3 VH de SEC ID Nº: 21, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID Nº: 23, una CDR2 VL de SEC ID Nº: 24 y una CDR3 VL de SEC ID Nº: 25.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 28, una CDR2 VH de SEC ID N°: 29 y CDR3 VH de SEC ID N°: 30, y puede comprender además una
5 región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 32, una CDR2 VL de SEC ID N°: 33 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 34.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende
10 una CDR1 VH de SEC ID N°: 37, una CDR2 VH de SEC ID N°: 38 y CDR3 VH de SEC ID N°: 39, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 42, una CDR2 VL de SEC ID N°: 43 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 44.

15 En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 46, una CDR2 VH de SEC ID N°: 47 y CDR3 VH de SEC ID N°: 48, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de
20 SEC ID N°: 50, una CDR2 VL de SEC ID N°: 51 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 52.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 54, una CDR2 VH de SEC ID N°: 55 y

CDR3 VH de SEC ID N°: 56, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 58, una CDR2 VL de SEC ID N°: 59 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 60.

5 En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°:62, una CDR2 VH de SEC ID N°: 63 y CDR3 VH de SEC ID N°: 64, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de
10 SEC ID N°: 66, una CDR2 VL de SEC ID N°: 67 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 68.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 70, una CDR2 VH de SEC ID N°: 71 y
15 CDR3 VH de SEC ID N°: 72, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 74, una CDR2 VL de SEC ID N°: 75 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 76.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede
20 comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 79, una CDR2 VH de SEC ID N°: 80 y CDR3 VH de SEC ID N°: 81, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 84, una CDR2 VL de SEC ID N°: 85 y una CDR3 VL de

SEC ID N°: 86.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 88, una CDR2 VH de SEC ID N°: 89 y
5 CDR3 VH de SEC ID N°: 90, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 91, una CDR2 VL de SEC ID N°: 92 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 93.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede
10 comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 131, una CDR2 VH de SEC ID N°: 132 y CDR3 VH de SEC ID N°: 133, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 135, una CDR2 VL de SEC ID N°: 136 y una CDR3 VL
15 de SEC ID N°: 137.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 147, una CDR2 VH de SEC ID N°: 148 y CDR3 VH de SEC ID N°: 149, y puede comprender además una
20 región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 152, una CDR2 VL de SEC ID N°: 153 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 154.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende

una CDR1 VH de SEC ID N°: 147, una CDR2 VH de SEC ID N°: 148 y CDR3 VH de SEC ID N°: 149, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 326, una CDR2 VL de SEC ID N°: 327 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 328.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 156, una CDR2 VH de SEC ID N°: 157 y CDR3 VH de SEC ID N°: 158, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 160, una CDR2 VL de SEC ID N°: 161 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 162.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 164, una CDR2 VH de SEC ID N°: 165 y CDR3 VH de SEC ID N°: 166, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 168, una CDR2 VL de SEC ID N°: 169 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 170.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 172, una CDR2 VH de SEC ID N°: 173 y CDR3 VH de SEC ID N°: 174, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de

SEC ID N°: 176, una CDR2 VL de SEC ID N°: 177 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 178.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 180, una CDR2 VH de SEC ID N°: 181 y CDR3 VH de SEC ID N°: 182, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 184, una CDR2 VL de SEC ID N°: 185 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 186.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 188, una CDR2 VH de SEC ID N°: 189 y CDR3 VH de SEC ID N°: 190, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 192, una CDR2 VL de SEC ID N°: 193 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 194.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 196, una CDR2 VH de SEC ID N°: 197 y CDR3 VH de SEC ID N°: 198, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 200, una CDR2 VL de SEC ID N°: 201 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 202.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede

comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 204, una CDR2 VH de SEC ID N°: 205 y CDR3 VH de SEC ID N°: 206, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de
5 SEC ID N°: 208, una CDR2 VL de SEC ID N°: 209 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 210.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 212, una CDR2 VH de SEC ID N°: 213
10 y CDR3 VH de SEC ID N°: 214, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 216, una CDR2 VL de SEC ID N°: 217 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 218.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede
15 comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 220, una CDR2 VH de SEC ID N°: 221 y CDR3 VH de SEC ID N°: 222, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 224, una CDR2 VL de SEC ID N°: 225 y una CDR3 VL
20 de SEC ID N°: 226.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 228, una CDR2 VH de SEC ID N°: 229 y CDR3 VH de SEC ID N°: 230, y puede comprender además una

región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 232, una CDR2 VL de SEC ID N°: 233 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 234.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede
5 comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 236, una CDR2 VH de SEC ID N°: 237 y CDR3 VH de SEC ID N°: 238, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 240, una CDR2 VL de SEC ID N°: 241 y una CDR3 VL
10 de SEC ID N°: 242.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 244, una CDR2 VH de SEC ID N°: 245 y CDR3 VH de SEC ID N°: 246, y puede comprender además una
15 región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 248, una CDR2 VL de SEC ID N°: 249 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 250.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende
20 una CDR1 VH de SEC ID N°: 252, una CDR2 VH de SEC ID N°: 253 y CDR3 VH de SEC ID N°: 254, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 256, una CDR2 VL de SEC ID N°: 257 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 258.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de SEC ID N°: 260, una CDR2 VH de SEC ID N°: 261 y CDR3 VH de SEC ID N°: 262, y puede comprender además una
5 región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 264, una CDR2 VL de SEC ID N°: 265 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 266.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende
10 una CDR1 VH de SEC ID N°: 268, una CDR2 VH de SEC ID N°: 269 y CDR3 VH de SEC ID N°: 270, y puede comprender además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de SEC ID N°: 272, una CDR2 VL de SEC ID N°: 273 y una CDR3 VL de SEC ID N°: 274.

15 En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región V_H y/o V_L como se representa en las Figuras 1A a 1K y 3A a 3R.

En otra realización, un anticuerpo de la invención se
20 caracteriza por la conservación del emparejamiento afín de la cadena pesada y ligera que está presente en un linfocito B humano.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) que

comprende, o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 10, 18, 26, 35, 45, 53, 61, 69, 77, 87, 130, 138, 146, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259 y 267.

5 En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende, o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 6, 14, 22, 31, 40, 49, 57, 65, 73, 82, 122, 134, 142, 150, 151, 159, 167, 175, 183, 191, 10 199, 207, 215, 223, 231, 239, 247, 255, 263 y 271. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende, o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 10, 18, 26, 35, 45, 53, 15 61, 69, 77, 87, 130, 138, 146, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259 y 267, y comprende además una región variable de cadena ligera (VL) que comprende, o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 6, 14, 22, 20 31, 40, 49, 57, 65, 73, 82, 122, 134, 142, 150, 151, 159, 167, 175, 183, 191, 199, 207, 215, 223, 231, 239, 247, 255, 263 y 271. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEC ID N°: 1 y un VL de SEC ID N°: 6; o un VH de SEC ID N°: 10 y un VL de SEC ID N°: 14; o un VH de SEC ID N°: 18

y un VL de SEC ID N°: 22; o un VH de SEC ID N°: 26 y un VL de SEC ID N°: 31; o un VH de SEC ID N°: 35 y un VL de SEC ID N°: 40, o un VH de SEC ID N°: 45 y un VL de SEC ID N°: 49; o un VH de SEC ID N°: 53 y un VL de SEC ID N°: 57; o un VH de SEC ID N°: 61 y un VL de SEC ID N°: 65; o un VH de SEC ID N°: 69 y un VL de SEC ID N°: 73; o un VH de SEC ID N°: 77 y un VL de SEC ID N°: 82, o un VH de SEC ID N°: 87 y un VL de SEC ID N°: 122, o un VH de SEC ID N°: 130 y un VL de SEC ID N°: 134, o un VH de SEC ID N°: 138 y un VL de SEC ID N°: 142, o un VH de SEC ID N°: 146 y un VL de SEC ID N°: 150, o un VH de SEC ID N°: 146 y un VL de SEC ID N°: 151, o un VH de SEC ID N°: 155 y un VL de SEC ID N°: 159, o un VH de SEC ID N°: 163 y un VL de SEC ID N°: 167, o un VH de SEC ID N°: 171 y un VL de SEC ID N°: 175, o un VH de SEC ID N°: 179 y un VL de SEC ID N°: 183, o un VH de SEC ID N°: 187 y un VL de SEC ID N°: 191, o un VH de SEC ID N°: 195 y un VL de SEC ID N°: 199, o un VH de SEC ID N°: 203 y un VL de SEC ID N°: 207, o un VH de SEC ID N°: 211 y un VL de SEC ID N°: 215, o un VH de SEC ID N°: 219 y un VL de SEC ID N°: 223, o un VH de SEC ID N°: 227 y un VL de SEC ID N°: 231, o un VH de SEC ID N°: 235 y un VL de SEC ID N°: 239, o un VH de SEC ID N°: 243 y un VL de SEC ID N°: 247, o un VH de SEC ID N°: 251 y un VL de SEC ID N°: 255, o un VH de SEC ID N°: 259 y un VL de SEC ID N°: 263, o un VH de SEC ID N°: 267 y un VL de SEC ID N°: 271.

Como alternativa, la molécula de unión a TDP de la invención es un polipéptido tal como un anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, o un derivado o variante de este), que compite
5 por la unión con TDP-43, con al menos un anticuerpo que tiene una región V_H y/o V_L como se representa en las Figuras 1A a 1K y 3A a 3R. Los anticuerpos también pueden ser humanos, en particular para aplicaciones terapéuticas. Como alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo murino, murinizado o quimérico
10 murino-humano, que es particularmente útil para métodos de diagnóstico y estudios de eficacia y seguridad en animales.

Como se analiza en este documento, el epítipo de TDP-43 de un anticuerpo completamente humano es particularmente relevante para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas
15 debido al hecho de que el anticuerpo se generó inicialmente como resultado de una respuesta inmunitaria humana. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales humanos completamente humanos de la invención reconocen epítipos que tienen particular relevancia fisiológica y que podrían no estar
20 accesibles o ser inmunogénicos usando inmunización convencional y otros procesos de exploración de anticuerpos para la generación de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón y anticuerpos derivados de exploración *in vitro* de bibliotecas de presentación de fagos. Por lo tanto, la

invención también se extiende en general a anticuerpos anti TDP-43 y otras moléculas de unión a TDP-43 que compiten con un anticuerpo monoclonal humano de la invención por la unión específica con TDP-43. De acuerdo con una realización, el anticuerpo, u otra molécula de unión a TDP-43, compite con un anticuerpo que contiene los dominios variables divulgados en las Figuras 1A a 1K y 3A a 3R por la unión con TDP-43. En otra realización, el anticuerpo de otra molécula de unión a TDP-43 compite con un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1, NI205.29E11, NI205.9E12, NI205.98H6, NI205.10D3, NI205.44B2, NI205.38H2, NI205.36D5, NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31D2, NI205.8F8, NI205.31C11, NI205.8C10, NI205.10H7, NI205.1A9, NI205.14W3 y NI205.19G5, por la unión con TDP-43.

La invención también abarca anticuerpos anti TDP-43 y otras moléculas de unión a TDP-43 que se unen con el mismo epítipo de TDP-43 que un anticuerpo monoclonal humano de la invención. De acuerdo con una realización, el anticuerpo (incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a TDP-43 y variante o derivado de estos) u otra molécula de unión a TDP-43 se une con el mismo epítipo de TDP-43 que un anticuerpo que contenga los dominios variables divulgados en las Figuras

1A a 1K y 3A a 3R. En otra realización, el anticuerpo (incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a TDP-43 y variante o derivado de estos) u otra molécula de unión a TDP-43 se une con el mismo epítipo de TDP-43 que un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1, NI205.29E11, NI205.9E12, NI205.98H6, NI205.10D3, NI205.44B2, NI205.38H2, NI205.36D5, NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31D2, NI205.8F8, NI205.31C11, NI205.8C10, NI205.10H7, NI205.1A9, NI205.14W3 y NI205.19G5.

En otra realización, la invención abarca un anticuerpo (incluido un fragmento de unión a antígeno), variante o derivados del mismo), que se una específicamente a una secuencia polipeptídica TDP-43 seleccionada de: QYGDVMDVFiP (SEC ID N° 123); AAIGWGSASNA (SEC ID N° 124); DMTDELREFF (SEC ID N° 125), EDENDEP (SEC ID N° 126), VQVKKDL (SEC ID N° 127), KEYFSTF (SEC ID N° 128), IIKGISV (SEC ID N° 315), NQSGPSG (SEC ID N° 316), FNGGFGS (SEC ID N° 317), FGNSRGGGAGL (SEC ID N° 318), SNAGSGSGFNG (SEC ID N° 319), QLERSGRFGGN (SEC ID N° 320), EIPSEDD (SEC ID N° 321), FNGGFGSSMDS (SEC ID N° 322) y SINPAMMAAAQAALQSSWG MGMLASQ (SEC ID N° 323). En otra realización, la invención abarca un anticuerpo (incluido un fragmento de unión a antígeno), variante o derivados del

mismo), que se una específicamente a los polipéptidos de TDP-43 FGNSRGGGAGL (SEC ID N° 318) y SNAGSGSGFNG (SEC ID N° 319). En otra realización, la invención abarca un anticuerpo (incluido un fragmento de unión a antígeno), variante o
5 derivados del mismo), que se una específicamente al polipéptido de TDP-43 SINPAMMAAAQAALQSSWGMMGMLASQ (SEC ID N° 323). pero que no se una específicamente a SLPGGGAAAQAALQSSWGMMGMLASQ (SEC ID N° 314).

La competición entre anticuerpos se determina mediante
10 un ensayo en el que la inmunoglobulina en ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia frente a un antígeno común, tales como TDP-43. En la técnica existen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva y se pueden aplicar de forma rutinaria o modificar para analizar la
15 capacidad de dos compuestos para competir por la unión a un antígeno, tal como radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida directo o indirecto, inmunoensayo enzimático (EIA) de fase sólida directo o indirecto, ensato de competición de tipo sándwich; véase Sta li el al., Methods in Enzymology 9
20 (1983), 242- 253; EIA de biotina-avidina de fase sólida; véase Kirkland et al., J. Immunol. 137 (1986), 3614-3619, y Cheung et al., Virology 176 (1990), 546-552; ensayo de marcaje directo de fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcaje directo de fase sólida; véase Harlow y Lane,

Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA de marcaje directo de fase sólida usando el marcador ^{125}I ; véase Morel y col., Molec. Immunol. 25 (1988), 7-15 y Moldenhauer y col., Scand. J. Immunol. 32 (1990), 77-82. Normalmente, dicho ensayo implica el uso de TDP-43 purificado o agregados del mismo unidos a una superficie sólida o células portadores de estos, una inmunoglobulina para ensayo son marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada, por ejemplo un anticuerpo monoclonal humano de la invención. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcaje unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. En una realización, el ensayo de unión competitiva se realiza en las condiciones descritas para el ensayo ELISA en los ejemplos adjuntos. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos en competición) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente proximal al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca hidrancia estérica. Normalmente, cuando hay un exceso de un anticuerpo de competición, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos un 50% o un 75%.

Por tanto, la invención también se refiere a un anticuerpo (p. ej., un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo), en el que el anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión a TDP-43 mediante un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1, NI205.29E11, NI205.9E12, NI205.98H6, NI205. 10D3, NI205.44B2, NI205.38H2, NI205.36D5, NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31D2, NI205.8F8, NI205.31C11, NI205.8C10, NI2G5.1 0H7, NI205.1A9, NI205.14W3, y NI205.19G5.

La invención también proporciona anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en variantes (incluyendo derivados) de las moléculas de anticuerpo (p. ej., las regiones V_H y/o las regiones V_L) descritas en el presente documento, anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido TDP-43 o fragmento o variante del mismo. Se pueden usar técnicas estándar conocidas en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la invención, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR, que tienen como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo los derivados) codifican menos de 50

sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto a la región V_H, a la CDR1 de la V_H, a la CDR2 de la V_H, a la CDR3 de la V_H, a la región V_L, a la CDR1 de la V_L, a la CDR2 de la V_L o a la CDR3 de la V_L de referencia.

De acuerdo con una realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en una región variable ((V_H) de la cadena pesada de la inmunoglobulina, en la que al menos una de V_H-CDRS de la región variable de la cadena pesada o al menos dos de las V_H-CDRS de la región variable de la cadena pesada son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de V_H-CDR1, V_H-CDR2 o V_H-CDR3 de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Como alternativa, las regiones V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 de la V_H son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de V_H - CDR1, V_H-

CDR2 y V_H-CDR3 de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Por tanto, de acuerdo con la presente realización, una región variable de la cadena pesada de la invención tiene las secuencias

5 polipeptídicas de V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 relacionadas con los grupos mostrados en las Figuras 1 A-1K y 3A-3R. Mientras que las Figuras 1A-1K y 3A-3R muestran CDR de V_H definidas por el sistema Kabat, en la invención también se incluyen otras definiciones de CDR, por ejemplo CDR de V_H definidas por el

10 sistema Chothia, un experto en la técnica las puede identificar fácilmente usando los datos presentados en las Figuras 1A-1K y 3A-3R. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la V_H de referencia es la SEC ID N° 3, 1 1, 39, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 1 31, 139, 147,

15 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, or 268; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la V_H es la SEC ID N° 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 1 97, 205, 213, 221, 229, 237, 245, 253, 261, o 269; y la secuencia de

20 aminoácidos de la CDR3 de la V_H de referencia es la SEC ID N° 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133, 141, 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222, 230. 238, 246, 254, 262, o 270.

En otra realización, la invención proporciona un

polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en
o consiste en una región variable de la cadena pesada (V_H) de
la inmunoglobulina en la que las regiones V_H -CDR1, V_H -CDR2 y
 V_H -CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a
5 los grupos V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 mostrados en las Figuras
1A-1K y 3A-3R. En una realización, la secuencia de
aminoácidos de la CDR1 de la V_H es la SEC ID N° 3, 1 1, 19,
28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 1 31, 139, 147, 156, 164,
172, 1 80, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260,
10 o 268: la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la V_H de
referencia es la SEC ID N° 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71,
80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 181, 189, 197, 205, 213,
221, 229, 237, 245, 253, 261, o 269; y la secuencia de
aminoácidos de la CDR3 de la V_H de referencia es la SEC ID N°
15 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133, 141, 149,
158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222, 230, 238, 246,
254, 262, o 270.

En otra realización, la invención proporciona un
polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en
20 o consiste en una región variable de la cadena pesada (V_H) de
la inmunoglobulina en la que las regiones V_H -CDR1, V_H -CDR2 y
 V_H -CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a
los grupos V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 mostrados en las Figuras
1A-1K y 3A-3R, excepto por uno, dos, tres, cuatro, cinco,

seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en una cualquiera de V_H-CDR. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son conservadoras. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CD1 de la V_H es la SEC ID N° 3, 11, 19, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 131, 139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, or 268; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la V_H es la SEC ID N° 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205, 213, 221, 229, 237, 245, 253, 261, o 269; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la V_H es la SEC ID N° 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133, 141, 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262 o 270.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en una región variable (V_L) de la cadena ligera de la inmunoglobulina, en la que al menos una de V_L-CDR de la región variable de la cadena ligera o al menos dos de las V_H-CDR de la región variable de la cadena ligera son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % or 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de V_L-CDR1, V_L-CDR2 o V_L-CDR3 de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Como alternativa, las regiones V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 de la V_L son al menos

un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de V_L - CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Por tanto, de acuerdo con la

5 presente realización, una región variable de la cadena ligera de la invención tiene las secuencias polipeptídicas de V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 relacionadas con los polipéptidos mostrados en las Figuras 1A-1K y 3A-3R. Mientras que las Figuras 1A-1K y 3A-3R muestran V_L-CDR definidas por el

10 sistema Kabat, otras definiciones de CDR, por ejemplo las CDR de V_L definidas por el sistema Chothia, también están incluidas en la invención. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la AVL es la SEC ID N° 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135, 143, 152, 160, 168,

15 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la V_L de referencia es la SEC ID N° 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327; y la secuencia de

20 aminoácidos de la CDR3 de la V_L de referencia es la SEC ID N° 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328.

En otra realización, la invención proporciona un

polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de la cadena ligera (V_L) de la inmunoglobulina en la que las regiones V_L -CDR1, V_L -CDR2 y V_L -CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_L -CDR1, V_L -CDR2 y V_L -CDR3 mostrados en las Figuras 1A-1K. y 3A-3R. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la V_L es la SEC ID N° 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135, 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la V_L es la SEC ID N° 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la V_L es la SEC ID N° 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de la cadena pesada (V_H) de la inmunoglobulina en la que las regiones V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 mostrados en las Figuras 1A-1K y 3A-3R, excepto por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de

aminoácidos en una cualquiera de V_L-CDR. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son conservadoras. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la V_L es la SEC ID N° 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135, 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la V_L es la SEC ID N° 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la V_L es la SEC ID N° 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328.

De acuerdo con una realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de la cadena pesada (V_H) de la inmunoglobulina al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a una secuencia de aminoácido de la región variable de la cadena pesada (V_H) de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Por tanto, de acuerdo con la presente realización, una región variable de la cadena pesada de la invención tiene una secuencia polipeptídica relacionada con las regiones variables de la cadena pesada mostradas en las Figuras 1A-1K y 3A-3R. En una

realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) es la SEC ID N° 1, 10, 18, 26, 35, 45, 53, 61, 69, 77, 87, 130, 138, 146, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259, o 267.

5 En otra realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de la cadena pesada (V_H) de la inmunoglobulina que es idéntica a una región variable de la cadena pesada de referencia mostrada en las Figuras 1A-1K
10 y 3A-3R. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de referencia es la SEC ID N° 1, 10, 18, 26, 35, 45, 53, 61, 69, 77, 87, 130, 138, 146, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259, y 267.

15 En otra realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de la cadena pesada (V_H) de la inmunoglobulina que tiene una secuencia polipeptídica que es idéntica a una secuencia de la región variable de la
20 cadena pesada (V_H) de referencia mostrada en las Figuras 1A-1K y 3A-3R, excepto por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son conservadoras. En una realización, la secuencia de

aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de referencia es la SEC ID N° 1, 10, 18, 26, 35, 45, 53, 61, 69, 77, 87, 130, 138, 146, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259 o 267.

5 De acuerdo con una realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de la cadena ligera (V_L) de la inmunoglobulina al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a una secuencia de aminoácido
10 de la región variable de la cadena ligera (V_L) de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Por tanto, de acuerdo con la presente realización, una región variable de la cadena logera de la invención tiene una secuencia polipeptídica relacionada con las regiones variables de la
15 cadena ligera mostradas en las Figuras 1A-1K y 3A-3R. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) es la SEC ID N° 6, 14, 22, 31, 40, 49, 57, 65, 73, 82, 122, 134, 142, 150, 151, 159, 167, 175, 183, 191, 199, 207, 215, 223, 231, 239, 247, 255,
20 263 y 271.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de la cadena ligera (V_L) de la inmunoglobulina que es idéntica a una región variable de

la cadena ligera de referencia mostrada en las Figuras 1A-1K y 3A-3R. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de referencia es la SEC ID N° 6, 14, 22, 31, 40, 49, 57, 65,73, 82, 122, 134, 5 142, 150, 151, 159, 167, 175, 183, 191, 199, 207, 215, 223, 231, 239, 247, 255, 263 y 271.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una región variable de la cadena ligera (V_L) de la inmunoglobulina que tiene una secuencia polipeptídica que es idéntica a una secuencia de la región variable de la cadena ligera (V_L) de referencia mostrada en las Figuras 1A-1K y 3A-3R, excepto por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos. En 10 determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son conservadoras. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de referencia es la SEC ID N° 6, 14, 22, 31, 40, 49, 57, 65,73, 82, 122, 134, 142, 150, 151, 159, 167, 15 575, 183, 191, 199, 207, 215, 223, 231, 239, 247, 255, 263, y 20 271.

Una inmunoglobulina o el ácido nucleico que la codifica (p. ej., un ADNc) puede modificarse además. Por tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la invención

comprende una cualquiera de la(s) etapa(s) de producción de un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo monocatenario, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de cualquiera de estos. En la técnica se conocen procedimientos correspondientes y se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos mediante, por ejemplo, se puede usar la técnica de expresión en fagos, resonancia de plasmón superficial como se usa en el sistema BIAcore, para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fagos que se unen al mismo epítipo que el de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe en, por ejemplo, la publicación de solicitud internacional n° WO89/09622. Procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, la solicitud europea EP-A1 0239 400 y la solicitud internacional WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos a usar de acuerdo con la invención es la de los denominados anticuerpos xenogeneicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogeneicos tales como anticuerpos de tipo

humano en ratones se describe en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud internacional n° WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO 96/33735. Como se ha tratado anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en

5 diversas formas además de anticuerpos completos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como en cadenas sencillas; véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud internacional n° WO88/09344.

Los anticuerpos de la invención o sus correspondientes

10 cadenas de inmunoglobulina se pueden modificar además usando técnicas convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, usando delección(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) y/o recombinación(es) de aminoácidos, y/u otra(s) modificación(es) conocidas en la técnica, solas o en

15 combinación. El experto en la técnica conoce bien los procedimientos de introducción de dichas modificaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina, véase, por ejemplo, Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,

20 Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates y Wiley interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes,

incluyendo modificaciones en una sola cadena, modificaciones en la estructura y modificaciones en los extremos N y C, incluyendo acetilación, hidroxilación, mutilación, amidación y la unión de hidratos de carbono o restos lipídicos, con factores y similares. Asimismo, la invención abarca la producción de proteínas quiméricas (es decir, proteínas de fusión), que comprenden los polipéptidos de unión a TDP-43 de la invención, tales como anticuerpos, en el extremo amino condensado una molécula heteróloga, tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo carboxilo, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud internacional n° WO00/30680 para los correspondientes detalles técnicos.

Además, la invención abarca péptidos y polipéptidos que se unen específicamente a TP-43. Por ejemplo, que contienen la región CDR3 de la región variable de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados, en particular la CDR3 de la cadena pesada, ya que con frecuencia se ha observado que la CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) es la región que tiene un mayor grado de variabilidad y una participación predominante en la interacción antígeno-anticuerpo. Dichos péptidos y polipéptidos pueden sintetizarse o producirse fácilmente por medios recombinantes para producir una molécula de unión a TDP-43 de la invención. Los expertos en la técnica conocen dichos procedimientos. Los péptidos se pueden sintetizar

usando, por ejemplo, sintetizadores peptídicos automáticos que están disponibles comercialmente. Los péptidos también se pueden producir mediante técnicas recombinantes incorporando el ADN que expresa el péptido en un vector de expresión y transformando las células con el vector de expresión para producir el péptido.

De acuerdo con lo anterior, la invención se refiere a las moléculas de unión a TDP-43 tales como, anticuerpos (p. ej., un fragmento de unión a TDP-43 de un anticuerpo) que muestra una o más propiedades de las moléculas de unión a TDP-43 descritas en este documento. Por ejemplo, dichos anticuerpos y moléculas de unión se pueden analizar para determinar su especificidad y afinidad de unión mediante, por ejemplo, ELISA o transferencia de tipo Western, e inmunohistoquímica como se describe en este documento; véase, por ejemplo, los Ejemplos. Como se divulga en el ejemplo 2, la semiconcentración máxima eficaz (CE_{50}) de NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1, NI205.29E11, NI205.9E12, NI205.98H6, NI205.10D3, NI205.44B2, NI205.38H2, NI205.36D5, NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31 D2, NI205.8F8, NI205.31C1 1, NI205.8C10, NI205.10H7, NI205.1A9, NI205.14W3, y NI205.19G5, se determinó para el TDP-43 humano mediante ELISA

directo para unir el TDP- 43 humano con una afinidad elevada a una CE_{50} (0,18-17,2 nM) sub-med, nanomolar.

Como alternativa a la obtención de inmunoglobulinas directamente del cultivo de linfocitos B inmortalizados o
5 linfocitos B de memoria, las células inmortalizadas se pueden usar como fuente de loci reorganizados de cadenas pesadas y cadenas ligeras para su posterior expresión y/o manipulación genética. Los genes de anticuerpos reorganizados se pueden someter a transcripción inversa a partir de ARNm adecuados
10 para producir ADNc. Si se desea, la región constante de la cadena pesada se puede intercambiar por la de un isotipo diferente o eliminar completamente. Las regiones variables se pueden unir para codificar regiones Fv de cadena sencilla. Múltiples regiones Fv se pueden unir para conferir capacidad
15 de unión a más de una diana o se pueden usar combinaciones de cadenas pesadas y ligeras quiméricas. Una vez que está disponible el material genético, el diseño de análogos que retienen la capacidad de unirse a una diana deseada es directo. Los procedimientos para clonar las regiones
20 variables del antcuerpo y la generación de los anticuerpos recombinantes se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Gilliland y col., Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke y col., Leukemia 11 (1997), 1787 - 1792.

Una vez que se obtiene el material genérico adecuado y,

si se desea, se ha modificado para codificar un análogo, las secuencias de codificación, incluidas las que codifican, como mínimo, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, se pueden insertar en sistemas de expresión
5 contenidos en vectores que se pueden transfectar en células huésped recombinantes estándar. Se pueden usar diversas de estas células huésped; no obstante, para un procesamiento eficiente se pueden considerar las células de mamífero. Entre las líneas celulares de mamífero útiles para este fin se
10 incluyen, a título enunciativo, células CHO, células HEK 293 o células NSO.

La producción del anticuerpo o análogo se lleva a cabo después cultivando el huésped recombinante modificado en condiciones de cultivo adecuados para el crecimiento de las
15 células huésped y la expresión de las secuencias de codificación. Después, los anticuerpos se recuperan mediante su aislamiento del cultivo. Los sistemas de expresión están diseñados para incluir péptidos señal para que los anticuerpos resultantes se secreten en el medio; no obstante,
20 también es posible la producción intracelular.

De acuerdo con lo anterior, la invención también se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo o molécula de unión equivalente de la invención. En una realización, el polinucleótido codifica al menos una región

variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Normalmente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de las V_H y/o V_L de la región variable de dicho anticuerpo.

El experto en la técnica apreciará fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito anteriormente se puede usar para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y de función biológica deseadas. Por tanto, la invención también abarca polipéptidos y anticuerpos que comprenden al menos una CDR del dominio variable descrito anteriormente y que, de forma ventajosa, tienen sustancialmente las mismas o similares propiedades de unión que el anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos. Como generalmente se entiende en la técnica, la afinidad de unión se puede potenciar realizando sustituciones de aminoácidos dentro de las CDR o dentro de los bucles hipervariables (Chothia and Lesk, J. Mol Biol. 196 (1987), 901 -917) que parcialmente solapan con las CDR como define Kabat; véase, por ejemplo, Riechmann, y col., Nature 332 (1988), 323-327. Por tanto, la invención también se refiere a anticuerpos en los que una o más de las CDR mencionadas comprende uno o más, o no más de dos, sustituciones de aminoácidos. En una realización, el

anticuerpo de la invención comprende en una o las dos cadenas de inmunoglobulina dos o las tres CDR de las regiones variables, como se expone en las Figuras 1A-1K y 3A-3R.

Las moléculas de unión, tales como anticuerpos
5 (incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos) de la invención, pueden comprender una región constante que participa en una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante del anticuerpo puede
10 activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además,
15 los anticuerpos se unen a los receptores sobre varias células mediante la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo a un receptor Fc (FcR) sobre una célula. Existe una serie de receptores de Fc que son específicos de diferentes clases de anticuerpos, incluyendo
20 IgG (receptores gamma), IgE (receptores Epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión de los anticuerpos a los receptores de Fc sobre las superficies celulares desencadena una serie de importantes y diversas respuestas biológicas incluyendo, engullido y destrucción de

las partículas recubiertas de anticuerpos, eliminación de complejos inmunitarios, lisis de células diana recubiertas por anticuerpos por las células asesinas (denominada citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.

De acuerdo con lo anterior, determinadas realizaciones de la invención incluyen un anticuerpo (incluyendo un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, variante o derivado del mismo), en el que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se ha sustituido, delecionado o alterado de otro modo para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas, capacidad para dimerizar no covalentemente, incremento de la capacidad para localizar en el sitio de agregación y depósito de TDP-43, reducción de la semivida en suero o incremento de la semivida en suero cuando se compara con un anticuerpo entero sin alterar de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, determinados anticuerpos para uso en los procedimientos diagnósticos y terapéuticos descritos en este documento son anticuerpos con un dominio delecionado que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de

uno o más dominios de la cadena pesada. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, en un anticuerpo de la invención falta un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, tal como, todo o parte del dominio

5 CH2. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención útil, por ejemplo, en procedimientos diagnósticos o terapéuticos, tienen una región constante, por ejemplo una región constante de la cadena pesada de IgG, que está alterada para eliminar la glicosilación, denominado en otros

10 lugares de este documento anticuerpos aglicosilados o "agli". Dichos anticuerpos "agli" se pueden preparar enzimáticamente o mediante otras técnicas conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, ingeniería del o los sitios de glicosilación consenso en la región constante. Aunque sin

15 desear quedar anclado por teoría alguna, se cree que los anticuerpos "agli" pueden tener un perfil mejorado de seguridad y estabilidad *in vivo*. Procedimientos para producir anticuerpos aglicosilados que tengan la función efectora deseada se encuentran en, por ejemplo, la publicación de

20 solicitud de patente internacional n° WO2005/018572, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

En determinadas realizaciones, incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y variantes descritas en este documento, la porción Fc se puede mutar para disminuir la

fundón efectora usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la delección o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante pueden reducir la unión al receptor de FC del anticuerpo modificado circulante, de modo que se incrementa la localización de TDP-43. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante consistentes con esta invención moderan la unión del complemento y, por tanto, reducen la servida en suero y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Otras modificaciones más de la región constante se pueden usar para modificar los enlaces disulfuro o los restos oligosacáridos que permiten potenciar la localización debido a un incremento de la especificidad por el antígeno o de la flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización de TDP-43, la biodistribución y la semivida en suero, se pueden medir de forma rutinaria usando técnicas conocidas en la materia.

En determinadas realizaciones, la porción fc de los anticuerpos de la invención han mutado o intercambiado por secuencias proteicas alternativas para aumentar la captación celular de los anticuerpos a modo de ejemplo, potenciar la endocitosis mediada por receptor de los anticuerpos a través

de los receptores Fc γ , LRP o receptores Thyl o mediante "Tecnología de Súperanticuerpos", que se dice que permite barajar los anticuerpos en el interior de las células vivas sin dañarlas (Mullet, S., y col., Expert Opin. Biol. Ther. 5 (2005), 237 - 241). Por ejemplo, la generación de proteínas de fusión de la región de unión al anticuerpo y los ligandos proteicos afines de los receptores de la superficie celular o anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos con secuencias específicas de unión a TDP-43, así como un receptor de 10 superficie celular se pueden modificar mediante ingeniería usando técnicas conocidas en la materia.

En determinadas realizaciones, incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y variantes descritos en este documento, la porción Fc se puede mutar o intercambiar por 15 secuencias proteicas alternativas o el anticuerpo se puede modificar químicamente para aumentar su penetración en la barrera hematoencefálica.

Las formas modificadas de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o 20 derivados de los mismos) de la invención se pueden fabricar a partir de anticuerpos enteros precursores o parentales usando técnicas conocidas en la materia. Ejemplos de técnicas se tratan con más detalle en este documento. Los anticuerpos de la invención, incluyendo fragmentos de anticuerpo de unión a

antígeno y variantes descritos en este documento, se pueden fabricar o preparar de forma rutinaria usando técnicas conocidas en la materia. En determinadas realizaciones, los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos y
5 derivados) se “producen de forma recombinante”, es decir se producen usando tecnología de ADN recombinante. Técnicas de ejemplo para fabricar anticuerpos se tratan con más detalle en otro lugar en este documento.

Los anticuerpos (incluyendo los fragmentos de unión a
10 antígeno de los anticuerpos y variantes, y derivados de los mismos) de la invención incluyen derivados que están modificados, por ejemplo mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no impida la unión específica del anticuerpo a su
15 epítipo afín. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado mediante, por ejemplo, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión
20 proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina etc. Además, el derivado

puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En realizaciones concretas, las moléculas de unión a TDP-43 de la invención son polipéptidos tales como anticuerpos (incluyendo fragmentos de unión a antígeno, 5 variantes o derivados de los mismos) que no provocan una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal que se va a tratar, por ejemplo en un ser humano. En determinadas realizaciones, las moléculas de unión, por ejemplo los anticuerpos (incluyendo los fragmentos de unión a antígeno de 10 los anticuerpos) de la invención derivan de un paciente, por ejemplo un paciente humano y, posteriormente, se usa en la misma especie de la cual derivan, por ejemplo un ser humano, de modo que alivia o minimiza la aparición de respuestas inmunitarias perjudiciales.

15 La desinmunización también se puede usar para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en este documento, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítomos de linfocitos T; véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud 20 internacional N° WO98/52976 y WO00/34317. Por ejemplo, las secuencias V_H y V_L del anticuerpo de partida se analizan y se crea un "mapa" de epítomo de linfocito T humano de cada región V que muestra la localización de epítomos en relación con las regiones determinantes de la complementariedad (CDR)

y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítomos de linfocitos T individuales del mapa del epítomo de linfocitos T se analizan con el fin de identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un riesgo bajo
5 de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña una serie de secuencias de V_H y V_H alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan después en una serie de polipéptidos de unión, por ejemplo anticuerpos específicos de TDP-43,
10 incluyendo fragmentos inmuno-específicos de los mismos, para uso en los procedimientos diagnósticos y terapéuticos divulgados en este documento, que después se analizan para determinar la función. Normalmente se generan y analizan entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Después, se clonan los
15 genes completos de las cadenas pesadas y ligeras que comprenden las regiones V modificadas y C humanas en vectores de expresión y los posteriores plásmidos se introducen en las líneas celulares para la producción del anticuerpo entero. Después, los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y
20 biológicos adecuados y se identifica la variante óptima.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, incluido el uso de tecnologías de expresión en fagos, hibridoma y recombinante, o una combinación de las mismas.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma, incluidas las conocidas y enseñadas en la técnica, por ejemplo en Harlow et al., "Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. (1988); Hammerling, y col., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N. Y., 563-681 (1981), referencias cada una de las cuales se incorporan en este documento en su totalidad. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria, no está limitada a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon aislado, incluido un clon eucariota, procariota o de fago, y no el procedimiento por el cual se produce. Por tanto, la expresión "anticuerpo monoclonal" no está limitada a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención derivan de linfocitos B humanos que se han inmortalizado mediante transformación con el virus de Epstein-Barr, como se describe en este documento. Por claridad, la expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento, no abarca un anticuerpo endógeno que se puede aislar del plasma de un organismo huésped.

En el proceso de hibridoma bien conocido (Kohler y col.,

Nature 256 (1975), 495), los linfocitos mortales o de vida relativamente corta, los linfocitos de un mamífero, por ejemplo linfocitos B derivados de un sujeto humano como se describe en este documento, se condensan con un alínea
5 celular tumoral inmortal (p. ej., una línea celular de mieloma), de modo que se producen células híbridos o "hibridomas" que son inmortales y capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente del linfocito B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas sencillas
10 mediante selección, dilución y recrecimiento, comprendiendo cada cepa individual genes específicos para la formación de un anticuerpo sencillo. Los hibridomas seleccionados producen anticuerpos que son homogéneos contra un antígeno deseado y, en referencia a su linaje genético puro, se denominan
15 "monoclonales".

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales sin
20 condensar. Los reactivos, líneas celulares y procedimientos para formar, seleccionar y cultivar hibridomas se conocen en la técnica. Generalmente, el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno

deseado. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante ensayos *in vitro* tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo
5 inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), como se describe en este documento. Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se subclonan mediante procedimientos de dilución límite y se cultivan
10 mediante procedimientos estándar; véase, por ejemplo, Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pág. 59-103 (1986). También se apreciará que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones de hibridoma se pueden separar del medio de cultivo, fluido
15 ascítico o suero mediante procedimientos de purificación convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En otra realización, los linfocitos se seleccionan
20 mediante micromanipulación y se aíslan los genes variables. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica se pueden aislar de un mamífero inmunizado o inmune de forma natural, por ejemplo un ser humano, y cultivar durante aproximadamente 7 días *in Vitro*. Después, los cultivos de

PBMC se someten a detección selectiva de IgG específicas que cumplen los criterios de selección y se aíslan las células de los pocillos positivos. Los linfocitos B productores de Ig individuales se pueden aislar mediante FACS o
5 identificándolos en un ensayo en placa hemolítica mediada por el complemento. Los linfocitos B productores de Ig individuales se pueden micromanipular en un tubo y los genes de V_H y V_L se pueden amplificar usando, por ejemplo, PCR-RT. Los genes de V_H y V_L se pueden clonar en un vector de
10 expresión de anticuerpos y transfectar en las células (p. ej., células eucariotas o procariotas) para su expresión.

Como alternativa, las líneas celulares productoras de anticuerpos se pueden seleccionar y cultivar usando o modificando de forma rutinaria las técnicas conocidas en la
15 materia. Dichas técnicas se describen en varios manuales de laboratorio y publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas, las técnicas adecuadas para usar en la invención como se describe más adelante se describen en Current Protocols in Immunology, Coligan y col., Eds., Green
20 Publishing Associates and Wiley- Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad, incluyendo los suplementos.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen antígenos y/o epítomos se pueden generar usando técnicas conocidas en la

técnica. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos Fab y $F(ab')_2$ de forma recombinante o mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina
5 (para producir fragmentos $F(ab')_2$). Los fragmentos $F(ab')_2$ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Dichos fragmentos son suficientes para usar, por ejemplo, en procedimientos inmunodiagnósticos que implican acoplamiento
10 las porciones inmuno-específicas de inmunoglobulinas para detectar reactivos tales como radioisótopos.

Los anticuerpos completamente humanos, tales como los descritos en este documento, son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los
15 anticuerpos humanos de la invención se aíslan de, por ejemplo, sujetos sanos ancianos que, debido a su edad, se puede sospechar que están en riesgo de desarrollar un trastorno, por ejemplo esclerosis lateral amiotrófica y/o degeneración lobular frontotemporal o un paciente con el
20 trastorno pero con una evolución de la enfermedad inusualmente estable. No obstante, aunque es prudente esperar que los sujetos ancianos sanos y sin síntomas, respectivamente, habrán desarrollado anticuerpos protectores anti-TDP-43 con más regularidad que los sujetos sanos, estos

últimos se pueden usar también como fuente para obtener un anticuerpo humano de la invención. Esto es particularmente cierto para los pacientes más jóvenes que están predispuestos a desarrollar una forma familiar de unas proteinopatías de TDP-43 pero permanecen sin síntomas, ya que su sistema inmunitario y la respuesta inmunitaria funcionan más eficientemente que en adultos mayores.

Los anticuerpos de la invención se pueden producir por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, incluyendo, en particular, síntesis química o técnicas de expresión recombinante, como se describe en este documento.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una región constante sintética en la que uno o más dominios se eliminan parcial o completamente ("anticuerpos con delección de dominio"). En determinadas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones de dominio delecionado o variantes en las que la totalidad del dominio CH2 se ha eliminado (construcciones Δ CH2). Para otras realizaciones, un corto péptido de conexión se puede sustituir por el dominio delecionado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimientos para la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que

dichas construcciones pueden ser deseables debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 sobre la tasa catabólica del anticuerpo. Las construcciones con dominio delecionado se pueden derivar usando un vector que codifica un dominio constante humano de IgG₁; véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO02/060955 y WO02/096948A2. Este vector se modifica mediante ingeniería para eliminar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante de IgG₁ con delección de dominio.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos (incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos) de la invención son minicuerpos. Los minicuerpos se pueden realizar usando procedimientos conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.837.821 o la publicación de solicitud internacional n° WO 94/09817.

En una realización, un anticuerpo (p. ej., fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de un anticuerpo) de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene delección o sustitución de unos pocos o incluso de un único aminoácido, siempre que permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente

la unión a Fc y, de este modo, incrementar la localización de TDP-43. De un modo similar, puede ser deseable simplemente delecionar la parte de uno o más dominios de la región constante que controla la modulación de la función efectora (p. ej., la unión al complemento). Dichas delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero) dejando otras funciones deseadas asociadas al dominio intacto de la región constante del sujeto. Además, como se ha indicado anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos divulgados pueden sintetizarse mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencia el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible alterar la actividad proporcionada mediante un sitio de unión conservado (p. ej., unión a Fc) al tiempo que mantienen sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Otras realizaciones más comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar las características deseables tales como la función efectora o proporcionar más citotoxina o unión del carbohidrato. En dichas realizaciones puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas eribadas de dominios de región constante seleccionados.

La invención también proporciona anticuerpos que

comprenden, consisten esencialmente en o consisten en variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos (p. ej., las regiones V_H y/o las regiones V_L) descritos en este documento, anticuerpos (fragmentos de anticuerpos inductores) que se unen inmuno-específicamente a TDP-43. Se pueden usar técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, incluyendo, a título enunciativo, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR, que tienen como resultado sustituciones de aminoácidos. En una realización, las variantes (incluyendo los derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 1 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto a la región V_H de referencia, a la CDR1 de la V_H , a la CDR2 de la V_H , a la CDR3 de la V_H , a la región V_L , a la CDR1 de la V_L , a la CDR2 de la V_L o a la CDR3 de la V_L . Una "sustitución conservadora de aminoácido" es una en la que el residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de

aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, se pueden introducir mutaciones aleatorias a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden someter a detección selectiva según la actividad biológica para identificar mutantes que conserven actividad (p. ej., la capacidad para unirse a TDP-43).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones únicamente en las regiones estructurales o únicamente en las regiones CDR de un anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser silenciosas o mutaciones neutras de sentido erróneo, por

ejemplo que tienen ninguno, o poco efecto, sobre la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno, de hecho algunas de estas mutaciones no alteran la secuencia de aminoácidos de ningún modo. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para
5 optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Como alternativa, las mutaciones no neutras de sentido erróneo pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno. Es probable que la localización de la mayoría de las mutaciones silenciosas o
10 neutras de sentido erróneo sea en las regiones estructurales, mientras que es probable la localización de la mayoría de las mutaciones no neutras de sentido erróneo sea en las CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la técnica puede diseñar y analizar moléculas alteradas para
15 determinar las propiedades deseadas, incluyendo, por ejemplo, mejoras en la actividad de unión a antígeno o cambios en la especificidad del anticuerpos. Tras la mutagénesis, las proteínas que muestran las propiedades deseadas pueden expresarse de forma rutinaria y/o la actividad biológica de
20 la proteína codificada (p. ej., la capacidad para unirse inmuno-específicamente a al menos un epítipo de TDP-43) se puede determinar usando o modificando de forma rutinaria las técnicas conocidas en la materia.

Los anticuerpos anti-TDP-43 de esta invención se pueden

caracterizar usando cualquier modelo *in vivo* o *in vitro* de
 proteinopatías de TDP-43. Un experto en la técnica entiende
 fácilmente que un anticuerpo anti-TDP-43 de la invención se
 puede caracterizar en un modelo de ratón para proteinopatías
 5 de TDP-43, por ejemplo, a título enunciativo, uno cualquiera
 de los modelos animales para proteinopatías de TDP-43
 descritas en el ejemplo 5. Wegorzewska y col., Proc. Natl.
 Acad. Sci. U.S.A. 106 (2009), 18809-14; Gurney y col.,
 Science 264 (1994), 1 772- 75; Shan y col., Neuropharmacol.
 10 Letters 458 (2009), 70-74; Wils y col., Proc. Natl. Acad.
 Sci. USA. 106 (2010), 3858-63; Duchen and Strich, J. Neurol.
 Neurosurg, Psychiatry 31 (1968), 535-42; Dennis y Citron,
 Neuroscience 185 (2009), 745-50; Swamp y col., Brain 134
 (2011), 2610-2626; Igaz y col., J Clin invest. 121(2): 726-38
 15 (2011); Caccamo et al. Am J Pathol. 180(1): 293-302 (2012),
 Cannon y col., Acta Neuropathol. 123(6): 807-23 (2012),
 Custer y col., Hum Mol Genet. 19(9): 1741-55 (2010): y Tatom
 y col., Mol Ther. 17 (2009), 607-613.

Un experto en la técnica entiende que un modelo
 20 experimental de proteinopatía de TDP-43 se puede usar en un
 contexto preventivo o se puede usar en un contexto
 terapéutico. En un contexto preventivo, la dosificación de
 los animales comienza antes del inicio de la proteinopatía de
 TDP-43 o síntomas de la misma. En contextos preventivos, un

anticuerpo anti-TDP-43 de la invención se evalúa para determinar su capacidad para prevenir, reducir o retrasar el inicio de la proteinopatía de TDP-43 o síntomas de la misma. En un contexto terapéutico, la dosificación de los animales comienza después del inicio de la proteinopatía de TDP-43 o síntomas de la misma. En un contexto terapéutico, un anticuerpo anti-TDP-43 de la invención se evalúa para determinar su capacidad para tratar, reducir o aliviar la proteinopatía de TDP-43 o un síntoma de la misma. Los síntomas de las proteinopatías de TDP-43 incluyen, a título enunciativo, acumulación de depósitos de TDP-43 patológicos, distribución de TDP-43 patológica, TDP-43 fosforilado o fracciones de TDP-43 insolubles en las neuronas, cerebro, médula espinal, líquido cefalorraquídeo o suero del objeto experimental. Un experto en la técnica entiende que un resultado preventivo o terapéutico positivo en cualquier modelo animal de proteinopatías de TDP-43 indica que el anticuerpo anti-TDP-43 concreto se puede usar para fines preventivos o terapéuticos en un sujeto distinto al organismo del modelo experimental, por ejemplo, se puede usar para tratar las proteinopatías de TDP-43 en un sujeto humano que lo necesite.

En una realización, un anticuerpo anti-TDP-43 de la invención se puede administrar a un modelo de ratón de

proteinopatía de TDP-43 y los correspondientes ratones salvajes control. El anticuerpo administrado puede ser un anticuerpo murinizado de esta invención o una quimera humana-murina de un anticuerpo de esta invención. El anticuerpo anti-TDP-43 se puede administrar por cualquier medio conocido en la materia, por ejemplo, mediante administración intraperitoneal, intracraneal, intramuscular, intravenosa, subcutánea, oral y en aerosol. Se puede administrar a los animales experimentales una, dos, tres, cuatro, cinco o más dosis del anticuerpo anti- TDP-43 o una composición control, tal como PBS. En una realización, se administrará a los animales experimentales una o dos dosis de un anticuerpo anti- TDP-43. En otra realización, los animales reciben dosis crónicamente del anticuerpo anti- TDP-43 durante varias semanas o meses. Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente un régimen de dosificación que encaje en el propósito experimental, por ejemplo un régimen de dosificación para estudios agudos, régimen de dosificación para estudios crónicos, régimen de dosificación para estudios de toxicidad, régimen de dosificación para estudios preventivos o terapéuticos. La presencia del anticuerpo anti-TDP-43 en un compartimento tisular concreto de los animales experimentales, por ejemplo, a título enunciativo, suero, sangre, líquido cefalorraquídeo, tejido cerebral, se puede

establecer usando procedimientos bien conocidos en la materia. En una realización, un anticuerpo anti-TDP-43 de la invención puede atravesar la barrera hematoencefálica. En otra realización, un anticuerpo anti-TDP-43 de la invención puede entrar en las neuronas. Un experto en la técnica entiende que ajustando la dosis del anticuerpo anti-TDP-43 y la frecuencia de dosificación, una concentración deseada del anticuerpo anti-TDP-43 se puede mantener en los animales experimentales. Cualquier efecto de un anticuerpo anti-TDP-43 de esta invención en los modelos de proteinopatía de TDP-43 se puede evaluar comparando el nivel, las características bioquímicas o la distribución de TDP-43 en los animales tratados y control. En una realización, un anticuerpo de esta invención puede reducir el nivel, la cantidad o la concentración de las inclusiones de TDP-43 en el cerebro o la médula espinal en un modelo animal. El anticuerpo puede reducir el nivel, la cantidad o la concentración de las inclusiones de TDP-43 en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. En otra realización, un anticuerpo de esta invención puede reducir el número o la frecuencia de neuronas positivas a inclusiones de TDP-43 en el cerebro o la médula espinal en un modelo animal, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. El efecto de un anticuerpo de

esta invención también se puede evaluar examinando la distribución y las propiedades bioquímicas de TDP-43 tras la administración del anticuerpo. En una realización, un anticuerpo de esta invención puede reducir la cantidad o la

5 concentración de la proteína TDP-43 citoplasmática en el cerebro o la médula espinal de un modelo animal, por ejemplo en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. En otra realización, anticuerpo de esta invención puede reducir la cantidad o la concentración de la

10 proteína TDP-43 neurítica en el cerebro o la médula espinal de un modelo animal, por ejemplo en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90% o más. En una realización adicional, un anticuerpo de esta invención puede reducir la cantidad o la concentración de la proteína TDP-43

15 fosforilada en el cerebro o la médula espinal en un modelo animal, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. La TDP-43 fosforilada se puede detectar usando anticuerpos específicos de formas fosforiladas patológicamente de TDP-43, tales como p403/p404

20 y p409/p410. Hasegawa et al., Ann Neurol, 64(1): 60-70 (2008). Un anticuerpo de esta invención puede alterar, por ejemplo, reducir o aumentar la concentración de TDP-43 en sangre, suero o líquido cefalorraquídeo de un modelo animal en, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 20 %, 30

%, 50 %, 70 %, 90 % o más. En una realización, el % de reducción o incremento es relativo en comparación con el nivel, el número, la frecuencia, la cantidad o la concentración que existía antes del tratamiento o con el nivel, el número, la frecuencia, la cantidad o la concentración que existía en un sujeto sin tratar/control tratado.

En una realización, un anticuerpo de esta invención puede prevenir o retrasar el inicio de al menos un síntoma de una proteinopatía de TDP-43 en un sujeto. En una realización, un anticuerpo de esta invención puede reducir o eliminar al menos un síntoma de una proteinopatía de TDP-43 en un sujeto. El síntoma puede ser la formación de depósitos patológicos de TDP-43, depósitos de TDP-43 fosforilada o depósitos de TDP-43 insolubles. El síntoma también puede ser la presencia, o la concentración o cantidad elevada, de TDP-43 en suero, sangre, orina o líquido cefalorraquídeo, en el que la concentración o cantidad elevada se compara con la de un sujeto sano. El síntoma puede ser un síntoma neurológico, por ejemplo, aversión al gusto condicionado alterado, acondicionamiento al miedo contextual alterado, deterioro de la memoria, pérdida de función motora. En una realización, el deterioro de la memoria se evalúa usando una tarea del laberinto Y de dos pruebas. En una realización, el al menos un síntoma se reduce

en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, o 90 %. En otra realización, la proporción de la atarea del laberinto Y de dos pruebas es significativamente superior en un sujeto tratado con anticuerpos que en un sujeto control. En una realización específica, la proporción de la atarea del laberinto Y de dos pruebas aumenta en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 %. En otra realización, la proporción de la atarea del laberinto Y de dos pruebas es de al menos aproximadamente dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, diez veces o veinte veces mayor. Esta invención también proporciona un procedimiento de prevenir o retrasar el inicio de al menos un síntoma de una proteinopatía de TDP-43 en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TDP-43 descrito en este documento. La presente invención también proporciona un procedimiento de reducir o eliminar el inicio de al menos un síntoma de una proteinopatía de TDP-43 en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TDP-43 descrito en este documento. En una realización, el sujeto es un organismo experimental tal como, a título enunciativo, un ratón transgénico. En una realización, el sujeto es un ser humano.

III. Polinucleótidos que codifican anticuerpos

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por cualquier poliribonucleótido o polidesoxirribonucléotido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenaria, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más típicamente, bicatenario, o una mezcla de regiones mono y bicatenaria. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por regiones de triple hebra que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, o una variante o derivado del mismo) también puede contener una o más bases modificadas o estructuras de ADN o ARN modificadas por estabilidad o por otras razones. Bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inopina. Se pueden realizar diversas

modificaciones al ADN y al ARN; por tanto, "polinucleótido" abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (p. ej., una porción de la cadena pesada de inmunoglobulina o porción de la cadena ligera) se puede crear introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifican la inmunoglobulina, de un modo tal que se introducen en la proteína codificada una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Las mutaciones se pueden introducir a través de técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida a un sitio y mutagénesis mediada por PCR. En una realización, las sustituciones conservadoras de aminoácidos se realizan en una o más posiciones de residuos de aminoácidos no son esenciales.

El ARN se puede aislar de los linfocitos B originales, de células de hibridoma o de otras células transformadas mediante técnicas estándar, tales como extracción con isotiocianato de guanidinio y precipitación seguida de centrifugación o cromatografía. Cuando sea deseable se puede aislar el ARNm del ARN total usando técnicas estándar tales como cromatografía en oligo dT celulosa. Las técnicas

adecuadas son familiares en la materia. En una realización, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo se pueden fabricar, simultánea o por separado, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa de acuerdo con procedimientos conocidos. La PCR se puede iniciar mediante cebadores de la región constante consenso o mediante cebadores más específicos basados en las secuencias de aminoácido y de ADN de las cadenas pesadas y ligeras publicadas. Como se ha tratado anteriormente, la PCR también se puede usar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas se pueden someter a detección selectiva con cebadores consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de la región constante humana.

El ADN, típicamente ADN plasmídico, se puede aislar de las células usando técnicas conocidas en la materia, se puede mapear con enzimas de restricción y secuenciar de acuerdo con técnicas conocidas estándar establecidas con detalle en, por ejemplo, las referencias anteriores en relación con técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético de acuerdo con la invención en cualquier momento durante el proceso de aislamiento o el posterior análisis.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste

esencialmente en o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable (V_H) de la cadena pesada de la inmunoglobulina, en la que al menos una de las CDR de la región variable de la cadena pesada o al menos dos de las V_H -

5 CDR de la región variable de la cadena pesada son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de V_H -CDR1, V_H -CDR2 o V_H -CDR3 de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Como alternativa, las regiones V_H -CDR1, V_H -

10 CDR2 y V_H -CDR3 de la V_H son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de V_H - CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Por tanto, de acuerdo con la presente realización,

15 una región variable de la cadena pesada de la invención tiene las secuencias polipeptídicas de V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 relacionadas con las secuencias polipeptídicas mostradas en las Figuras 1A-1K y 3A-3R. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CD1 de la V_H de referencia es la SEC ID

20 N° 3, 1 1, 19, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 13 1, 139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, o 268; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la V_H es la SEC ID N° 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205,

213, 221, 229, 237, 245, 253, 261, o 269; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la V_H de referencia es la SEC ID N° 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133, 141, 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222, 230, 238, 246, 5 254, 262, o 270. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada (V_H) de la inmunoglobulina, en la que las regiones V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-
10 CDR3 tienen las secuencias polipeptídicas de los grupos V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 mostrados en las Figuras 1A-1K y 3A-3R, excepto por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en una cualquiera de V_H-CDR. En determinadas realizaciones, las
15 sustituciones de aminoácidos son conservadoras. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la V_H es la SEC ID N° 3, 11, 19, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 131, 139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, o 268; la secuencia de aminoácidos
20 de la CDR2 de la V_H de referencia es la SEC ID N° 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132, 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205, 213, 221, 229, 237, 245, 253, 261, o 269; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la V_H es la SEC ID N° SEC ID N°: 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81, 90, 133,

141, 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262, o 270.

En otra realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste
5 esencialmente en o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable (V_L) de la cadena ligera de la inmunoglobulina, en la que al menos una de las V_L -CDR de la región variable de la cadena ligera o al menos dos de las V_L -CDR de la región variable de la cadena ligera son al menos un
10 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de V_L -CDR1, V_L -CDR2 o V_L -CDR3 de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Como alternativa, las regiones V_L -CDR1, V_L -CDR2 y V_L -CDR3 de la V_L son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95
15 %, 96 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de V_L - CDR1, V_L -CDR2 y V_L -CDR3 de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos divulgados en este documento. Por tanto, de acuerdo con la presente realización, una región variable de la cadena ligera de la invención tiene
20 las secuencias polipeptídicas de V_L -CDR1, V_L -CDR2 y V_L -CDR3 relacionadas con las secuencias polipeptídicas mostradas en las Figuras 1 A-1K y 3A-3R. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la V_L de referencia es la SEC ID N° 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135, 143, 152,

160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la V_L de referencia es la SEC ID N° 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 5 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327: y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la V_L de referencia es la SEC ID N° 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 154, 162, 170, 178, 1 86, 1 94, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328.

10 En otra realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera (V_L) de la inmunoglobulina en la que las regiones V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 tienen secuencias 15 polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 mostrados en las Figuras 1A-1K y 3A-3R, excepto por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en una cualquiera de V_L-CDR. En determinadas realizaciones, las sustituciones de 20 aminoácidos son conservadoras. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la V_L es la SEC ID N° 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135, 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272 o 326; la secuencia de aminoácidos de la CDR2

de la V_L es la SEC ID N° 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136, 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273 o 327; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la V_L es la SEC ID N° 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137, 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274 o 328.

Como se conoce en la técnica, "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos o dos polinucleótidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de un polipéptido o polinucleótido con la secuencia de un segundo polipéptido o polinucleótido. Cuando se trata en este documento, se puede determinar si cualquier polipéptido concreto es al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntico a otro polipéptido usando procedimientos y programas/software informático conocidos en la materia tales como, a título enunciativo, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wi 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, para hallar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Al usar BESTFIT o cualquier otro programa de

alineación de secuencias para determinar si una secuencia determinada es, por ejemplo, un 95% idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la invención, los parámetros se fijan de un modo tal que el porcentaje de identidad se calcula sobre la totalidad de la longitud de la secuencia polipeptídica de referencia y que se permiten los huecos de homología en hasta un 5% del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

En una realización de la invención, el polinucleótido comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos de la región V_H o V_L de un anticuerpo de unión a TDP-43 como se indica en la Tabla 3. A este respecto, un experto en la materia apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada puede codificar el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina o de sólo uno.

Tabla 3: Secuencias De nucleótidos de las regiones V_H y V_L de anticuerpos específicos de TDP-43

5

10

15

20

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL)	
NI-205.3F10	V _H	SEC ID N° 95
	V _L	SEC ID N° 96
NI-205.51C1	V _H	SEC ID N° 97
	V _L	SEC ID N° 98
NI-205.21G2	V _H	SEC ID N° 99
	V _L	SEC ID N° 100
NI-205.8A2	V _H	SEC ID N° 101
	V _L	SEC ID N° 102
NI-205.15F12	V _H	SEC ID N° 103
	V _L	SEC ID N° 104
NI-205.113C4	V _H	SEC ID N° 105
	V _L	SEC ID N° 106
NI-205.25F3	V _H	SEC ID N° 107
	V _L	SEC ID N° 108
NI-205.87E7	V _H	SEC ID N° 109
	V _L	SEC ID N° 110
NI-205.21G1	V _H	SEC ID N° 111
	V _L	SEC ID N° 112
NI-205.68G5	V _H	SEC ID N° 113
	V _L	SEC ID N° 114
NI-205.20A1	V _H	SEC ID N° 115
	V _L	SEC ID N° 116
NI205.41D1	V _H	SEC ID N° 275
	V _L	SEC ID N° 276
NI205.29E11	V _H	SEC ID N° 277
	V _L	SEC ID N° 278
NI205.9E12	V _H	SEC ID N° 279
	V _L	SEC ID N° 280

5

10

15

20

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL)	
	V _L	SEC ID N° 281
NI205.98H6	V _H	SEC ID N° 282
	V _L	SEC ID N° 283
NI205.10D3	V _H	SEC ID N° 284
	V _L	SEC ID N° 285
NI205.44B22	V _H	SEC ID N° 286
	V _L	SEC ID N° 287
NI205.38H2	V _H	SEC ID N° 288
	V _L	SEC ID N° 289
NI205.36D5	V _H	SEC ID N° 290
	V _L	SEC ID N° 291
NI205.58E11	V _H	SEC ID N° 292
	V _L	SEC ID N° 293
NI205.14H5	V _H	SEC ID N° 294
	V _L	SEC ID N° 295
NI205.31D2	V _H	SEC ID N° 296
	V _L	SEC ID N° 297
NI205.8F8	V _H	SEC ID N° 298
	V _L	SEC ID N° 299
NI205.31C11	V _H	SEC ID N° 300
	V _L	SEC ID N° 301
NI205.8C10	V _H	SEC ID N° 302
	V _L	SEC ID N° 303
NI205.10H7	V _H	SEC ID N° 304
	V _L	SEC ID N° 305
NI205.1A9	V _H	SEC ID N° 306
	V _L	SEC ID N° 307
NI205.14W3	V _H	SEC ID N° 308
	V _L	SEC ID N° 309
NI205.19G5	V _H	SEC ID N° 310
	V _L	SEC ID N° 310

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 % o 99 % o 95 % idénticas a la cadena pesada V_H de referencia. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de referencia es la SEC ID N° 1, 10, 18, 26, 35, 45, 53, 61, 69, 77, 87, 130, 138, 146, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259, o 267.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 % o 99 % o 95 % idénticas a la cadena ligera V_L de referencia. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de referencia es la SEC ID N° 6, 14, 22, 31, 40, 49, 57, 65, 73, 82, 122, 134, 142, 150, 151, 159, 167, 175, 183, 191, 199, 207, 215, 223, 231, 239, 247, 255, 263, o 271.

La invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención. Preferentemente, los polinucleótidos codifican un polipéptido que se une a TDP-43.

Además, los polinucleótidos que codifican los polinucleótidos de fusión, los fragmentos de Fab y otros derivados, como se describen en este documento, también se contemplan en la invención.

5 Los polinucleótidos se pueden producir o fabricar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos
10 sintetizados químicamente, por ejemplo como se ha descrito en Kutmeier et al., BioTechniques 17 (1994), 242, que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y la unión de dichos
15 oligonucleótidos y, después, la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

 Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o una variante o derivado del mismo) se puede
20 generar a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no se dispone de un clon que contenga un ácido nucleico que codifica un anticuerpo concreto, pero se conoce la secuencia de la molécula del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse a

partir de una fuente adecuada (p. ej., una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o un ácido nucleico, preferentemente ARN poliA+, aislado de, cualquier tejido o célula que exprese el anticuerpo
5 específico de TDP-43, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda oligonucleotídica específica de la
10 secuencia génica concreta para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. A continuación, los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR se pueden clonar en vectores de clonación replicables usando cualquier procedimiento bien
15 conocido en la técnica.

Una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, su secuencia de nucleótidos se puede
20 manipular usando procedimientos conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª

Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990); y Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, NY (1998), cuyos contenidos se incorporan en este documento por referencia en su totalidad), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

IV. Expresión de polipéptidos de anticuerpos

Tras la manipulación del material genético aislado para proporcionar un anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, o variante o derivado del mismo) de la invención, el polinucleótido que codifica el anticuerpo típicamente se inserta en un vector de expresión para la introducción en células huésped que se pueden usar para producir la cantidad deseada de anticuerpo. La expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana se describe en este documento. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica un anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, una porción del mismo (que preferentemente contiene el dominio variable de la cadena pesada o ligera), de la invención, el vector para la producción de un anticuerpo se puede producir mediante tecnología de ADN

recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, en este documento se describen procedimientos para preparar una proteína que expresa un polinucleótido que contiene una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo. Se pueden usar procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican anticuerpos y las señales adecuadas de control de la transcripción y la traducción. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por tanto, la invención proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un dominio variable de la cadena pesada o ligera, operablemente unida a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud internacional n° WO 86/05807 y la patente de EE.UU. n° 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo pueden clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada o la cadena ligera completas.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en este documento para indicar los vectores usados de acuerdo

con la invención como vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como se sabe en la técnica, dichos vectores se pueden seleccionar fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus.

5 En general, los vectores compatibles con esta invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción adecuados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad para entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas. Numerosos sistemas de vectores de expresión se

10 pueden usar para los fines de esta invención. Por ejemplo, una clase de vector usa elementos de ADN que derivan de virus animales, tales como el virus del papiloma bovino, el virus del polio, adenovirus, virus vacunal, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican

15 el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión al ribosoma. Además, las células que tienen integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de las células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar

20 prototrofia a un huésped autotrófico, resistencia a biocidas (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados como el cobre. El gen marcador seleccionable puede estar directamente unido a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducir en la misma célula mediante

cotransformación. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores de la transcripción, potenciadores y
5 señales de terminación.

En realizaciones concretas, los genes de la región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con las secuencias de codificación de la región constante de las cadenas pesada y ligera (p. ej., genes de la región
10 constante de las cadenas pesadas o ligeras humanas) como se ha tratado anteriormente. En una realización, esto se efectúa usando un vector de expresión patentado de Biogen IDEC, Inc., denominado NEOSPLA, divulgado en la patente de EE.UU. N° 6.159.730. Este vector contiene el promotor/potenciador del
15 citomegalovirus, el promotor principal de la beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, el exón 1 y el exón 2 de la neomicina fosfotransferasa, el gen de la dihidrofolato reductasa y la secuencia líder. Se has
20 encontrado que este vector tiene como resultado un nivel de expresión de anticuerpos muy alto tras la incorporación de genes de las regiones variables y constantes, transfección en células CHO, seguido de la selección en G418 que contiene medio y amplificación con metotrexato. Por supuesto,

cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar la expresión en células eucariotas se puede usar en la invención. Ejemplos de vectores adecuados incluyen, a título enunciativo, los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3,1, 5 pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA), y el plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). En general, la detección selectiva de grandes números de células transformadas para encontrar las que 10 expresan niveles altos adecuados de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina es experimentación de rutina que puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, sistemas robóticos. Los sistemas de vectores también se describen en las patentes de EE.UU. N° 5.736.137 y 5.658.570, cada una de las cuales se 15 incorpora en este documento por referencia en su totalidad. Este sistema proporciona niveles de expresión elevados, por ejemplo > 30 pg/célula/día. Otros sistemas vectores de ejemplo se divulgan en la patente de EE.UU. N° 6.413.777.

En otras realizaciones, los anticuerpos (p. ej., 20 fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos) de la invención se pueden expresar usando construcciones policistrónicas tales como las divulgadas en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2003-0157641 e incorporada por referencia en su

totalidad. En estos sistemas de expresión se pueden producir múltiples productos génicos de interés, tales como las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos, se pueden producir a partir de una única construcción policistrónica.

5 Estos sistemas usan de forma ventajosa un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias de IRES compatibles se divulgan en la patente de EE.UU. N° 6, 193.980, que también se incorpora en este documento. Los

10 expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión se pueden usar para producir con eficacia el rango completo de anticuerpos divulgados en la solicitud.

Más generalmente, una vez que se ha preparado el vector o la secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica

15 del anticuerpo, el vector de expresión se puede introducir en una célula huésped adecuada. La introducción del plásmido en la célula huésped se puede conseguir mediante varias técnicas conocidas en la materia. Estas incluyen, a título enunciativo, transfección, incluyendo liportrasnfección

20 usando, por ejemplo, Eugene o lipofectamina, fusión de protoplastos, precipitación en fosfato cálcico, fusión celular con ADN encapsulado, microinyección e infección con virus intacto. Típicamente, la introducción del plásmido en el huésped se produce mediante procedimientos estándar

conocidos en la técnica, tales como el procedimiento de coprecipitación en fosfato cálcico. Las células huésped que alojan la construcción de expresión se cultivan en condiciones adecuadas para la producción de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, y se analizan para determinar la síntesis proteica de cadenas pesadas y/o ligeras. Ejemplos no limitantes de técnicas de ensayo incluyen el ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) e inmunohistoquímica.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y, después, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para usar en los procedimientos descritos en este documento. Por tanto, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o una cadena pesada o ligera del mismo, operablemente unido a un promotor heterólogo. En realizaciones particulares para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden co-expresar en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, como se detalla más adelante.

La célula huésped se puede co-transfectar con dos

vectores de expresión de la invención, en el que el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de la cadena pesada y de la cadena ligera. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifique ambos polipéptidos, de la cadena pesada y de la cadena ligera. En estas situaciones, la cadena ligera se introduce de forma ventajosa antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxico; véase Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197. Las secuencias de codificación de las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Como se usa en este documento, "células huésped" hace referencia a células que alojan vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En descripciones de procesos de aislamiento de anticuerpos a partir de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable para indicar la fuente de un anticuerpo a menos que claramente se especifique lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar de células enteras centrifugadas o del cultivo

celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Para expresar anticuerpos para uso en procedimientos descritos en este documento se pueden usar varios sistemas de vector de expresión-huésped. Dichos sistemas de expresión representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias de codificación de interés y posteriormente purificarlas, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos adecuadas, expresan un anticuerpo de la invención in situ. Estas incluyen, a título enunciativo, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión en levaduras recombinantes que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión en virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión en virus recombinantes (p. ej., el virus del mosaico de la coliflor CaMV; el virus del mosaico

del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión en plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (p. ej., células COS, CHO, NSO, BLK, 293, 5 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de las células de mamífero (p. ej., promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (p. ej., el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7,5K del virus vacunal). En una realización, se usan 10 células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, y células eucariotas, especialmente para la expresión de anticuerpos recombinante enteros, se usan para la expresión de una molécula de un anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tales como células de ovario de hámster 15 chino (CHO), junto con un vector, como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos-, véase, por ejemplo, Foecking et al, Gene 45 (1986, 101; Cockett et al, Bio/Technology 8 (1990), 2.

20 Las líneas de células huésped usadas para la expresión proteica de moléculas de unión a TDP-43 de la invención incluyen, por ejemplo, células de origen mamífero; los expertos en la técnica tienen la capacidad de determinar líneas de células huésped concretas que son más adecuadas

para la expresión del producto génico deseado. Ejemplos de líneas de células huésped incluyen, a título enunciativo, células CHO (de ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR minus), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea renal de mono), COS (un derivado de la CVI con el antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de hámster neonato), MDCK, WI38, R1610 (fibroblastos de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea renal de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3,653 (mieloma de ratón), BFA-lclBPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos humanos) y 293 (riñón humano). En una realización específica, las líneas de células huésped son células CHO o 293. Las líneas de células huésped están disponibles fácilmente y disponibles típicamente en servicios comerciales, incluyendo, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tisulares, o en la literatura publicada.

Además, se puede escoger una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de las proteínas. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación

postraduccionales de proteínas y productos génicos. Se pueden escoger líneas celulares o sistemas de huéspedes adecuados de modo que se asegure una correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Con este fin se pueden usar

5 células huésped eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico.

Para la producción a largo plazo y con un rendimiento alto de proteínas recombinantes se prefiere la expresión

10 estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el anticuerpo de pueden modificar mediante ingeniería. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado mediante

15 elementos de control de la expresión adecuados (p. ej., promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, las células modificadas por ingeniería se pueden dejar crecer

20 durante 1-2 días en un medio enriquecido y, después, se pasan a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez,

se pueden clonar y expandir en las líneas celulares. Este procedimiento puede usarse de forma ventajosa para modificar mediante ingeniería las líneas celulares que expresan de forma estable el anticuerpo.

5 Se pueden usar numerosos sistemas de selección de acuerdo con esta invención, incluidos, entre otros, los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., Cell 11 (1997), 223), glutamina sintetasa, hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (Szybalski & Szybalski, 1992, 10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202) y se pueden usar los genes de la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22 (1980), 817) en las células tk-, gs-, hgpert- o aprt, respectivamente. Asimismo, se puede usar resistencia antimetabolitos como la base de la selección para los genes 15 siguientes: *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), :357; O'Hare y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, (1981), 1527; *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); *neo*, que 20 confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Goldspiel y col., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu y Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993),

191-217: TIB TECH 11 (1993), 155-215; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina(Santerre y col., Gene 30 (1984), 147. Procedimientos conocidos en la técnica de tecnología de AND recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel y
5 col., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer arid Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli. y col., (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994);
10 Colberre- Garapin y col., J. Mol. Biol. 150: 1 (1981), cada uno de los cuales se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar usando técnicas conocidas en la materia,
15 incluyendo, por ejemplo, amplificación en vector, véase, por ejemplo, Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. Academic Press, New York, Vol. 3. (1987). Cuando un marcador en el sistema de
20 vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el incremento del nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también

aumentará, véase Crouse y col., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

La producción *in vitro* permite aumentar para dar cantidades grandes de los polipéptidos deseados. Las técnicas para cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular se conocen en la materia e incluyen cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo en un reactor aéreo o en un reactor con agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas microesferas de agarosa o cartuchos de cerámica. En caso necesario y/o si se desea, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante procedimientos de cromatografía habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo después de la biosíntesis preferencial de un polipéptido de la región bisagra sintético o antes de o después de la etapa de cromatografía HIC descrita en este documento.

Los genes que codifican anticuerpos (incluyendo, por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos) de la invención también se pueden expresar en células que no sean de mamífero, tales como bacterias o células de insectos o levaduras o vegetales. Las bacterias que captan fácilmente ácidos nucleicos incluyen

miembros de las familias *Enterobacteriaceae*, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*, *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. También se apreciará que, cuando se expresan en

5 bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente forman parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben aislarse, purificarse y, después, ensamblarse en moléculas funcionales. Cuando se desean formas tetravalentes, las subunidades se autoensamblarán después en anticuerpos

10 tetravalentes; véase, por ejemplo, la publicación de solicitud internacional n° WO02/096948

En los sistemas bacterianos, de forma ventajosa se pueden seleccionar numerosos vectores de expresión en función del uso previsto para el anticuerpo que se exprese. Por

15 ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles elevados de productos proteicos de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores

20 incluyen, a título enunciativo, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 2 (1983), 1791), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede estar unida individualmente en el vector dentro del marco de la región de codificación lacZ, de modo que se produce una

proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13(1985), 3101-3109; Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños
5 como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas mediante adsorción y la unión a una matriz de esferas de glutatión-agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre.
10 Los vectores pGEX se han diseñado para que incluyan trombina o sitios de escisión por la proteasa del factor Xa de modo que el producto del gen diana clonado se pueda liberar de la fracción GST.

Además procariotas, también se pueden usar microbios
15 eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura del pan común, es la más usadas entre los microorganismos eucariotas, aunque habitualmente se dispone de otras varias cepas, por ejemplo *Pichia pastoris*. Para la expresión en *Saccharomyces*, habitualmente se usa el plásmido YRp7, por ejemplo,
20 (Stincheomb y col., Nature 282 (1979), 39; Kingsraan y col., Gene 7 (1979), 141 ; Tschemper y col., Gene 10 (1980), 157). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levaduras que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por

ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85 (1977), 12). La presencia de daños en *trp1* como característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona un ambiente eficaz para detectar transformación mediante
5 crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insectos, como vector para expresar genes extraños típicamente se usa el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV). El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de
10 codificación del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (p. ej., el gen de la poliedrina) del virus y se coloca bajo el control de un promotor de AcNPV, por ejemplo el promotor de la poliedrina).

Una vez que se ha expresado de forma recombinante
15 producido un anticuerpo de la invención, los anticuerpos enteros, sus dímeros, las cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo, por ejemplo,
20 cromatografía (p. ej., cromatografía en columna de intercambio iónico, de afinidad, particularmente de afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, por ejemplo precipitación en sulfato amónico, o

mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas; véase, por ejemplo, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Como alternativa, otro procedimiento para aumentar la afinidad de los anticuerpos de la invención se divulga en la publicación de patente de EE.UU. N° 2002-0123057 A1.

V. Proteínas de fusión y conjugados

En determinadas realizaciones, el polipéptido del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos que normalmente no están asociados con un anticuerpo. Ejemplos de modificaciones se describen con más detalle más adelante. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fv de una cadena de la invención puede comprender una secuencia ligadora flexible o se pueden modificar para añadir un resto funcional (p. ej., PEG, un fármaco, una toxina o un marcador tal como fluorescente, radioactivo, enzima, magnética nuclear, metal pesado y similares.

Un polipéptido de anticuerpo de la invención pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a TDP-43 de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión diana y al menos una porción heteróloga, es decir, una porción con la que no está ligado de forma natural en la

naturaleza. Las secuencias de aminoácidos normalmente pueden existir en proteínas distintas se juntan en el polipéptido de fusión o normalmente pueden existir en la misma proteína pero estar en una organización nueva en el polipéptido de fusión.

5 Las proteínas de fusión se pueden crear mediante, por ejemplo, síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada.

El término "heterólogo", como se aplica a un
10 polinucleótido o un polipéptido, significa que el polinucleótido o un polipéptido deriva de una entidad distinta de la del resto de entidades con las que se compara. Por ejemplo, como se usa en este documento, un "polipéptido heterólogo" que se va a fusionar con un anticuerpo, o un
15 fragmento de unión a antígeno, variante o análogo del "mismo deriva de un polipéptido no inmunoglobulínico de la misma especie o un polipéptido inmunoglobulínico y no inmunoglobulínico de una especie diferente.

Como se trata con más detalle en otro lugar deste
20 documento, los anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos) o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos de la invención pueden además condensarse de forma recombinante con un polipéptido

heterólogo en el extremo N o el extremo C o conjugarse químicamente (incluidas conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden condensarse de forma recombinate o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos radionúclidos o toxinas; véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud internacional WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de EE.UU. N°5.314.995; y la solicitud de patente europea n° EP 0396 387.

Los anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos) de la invención pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos codificados por el gen. Los anticuerpos pueden modificarse mediante procedimientos naturales, tales como procesamiento postraducciona, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una literatura de investigación voluminosa. Se pueden producir modificaciones en cualquier

lugar del anticuerpo, incluyendo la estructura peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, o sobre restos tales como hidratos de carbono, se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar
5 presente en los mismos grados o grados variables en varios sitios en un anticuerpo dado. Asimismo, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden estar ramificados como resultado de, por ejemplo, ubiquitinación y pueden ser cíclicos, con o sin
10 ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales postraduccionales o pueden fabricarse mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP ribosilación, amidación, unión
15 covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfotidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones
20 covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización,

selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación; véase, por ejemplo, *Proteins - structure and molecular properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2^a Ed., (1993); *Post-translational covalent modification of proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pág. 1-12 (1983); Seifter y col., Meth Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan y col., Ann. NY Acad. Sci. 663(1992), 48-62).

10 La invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, y un polipéptido heterólogo. En una realización, una proteína de fusión de la invención comprende, consiste esencialmente en o consiste en un

15 polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V_H de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V_L de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes de las mismas, y una secuencia

20 polipeptídica heteróloga. En otra realización, una proteína de fusión para uso en los procedimientos diagnósticos y de tratamiento divulgados en este documento comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno, dos, tres cualquiera de las

CDR de la V_H de un anticuerpo, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos, o la secuencia de aminoácidos de uno, dos, tres cualquiera de las CDR de V_L de un anticuerpo, o fragmentos, variantes o derivados del mismo, y una secuencia

5 polipeptídica heteróloga. En una realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V_H de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o variante del mismo, y una

10 una secuencia polipeptídica heteróloga, proteína de fusión que se une específicamente a TDP-43. En otra realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región V_H de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos una región V_L de un anticuerpo de la invención o

15 fragmentos, derivados o variantes de los mismos, y una una secuencia polipeptídica heteróloga. En una realización, las regiones V_H y V_L de la proteína de fusión corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a TDP-43. En otra realización más, una

20 proteína de fusión para uso en los procedimientos diagnósticos y de tratamiento divulgados en este documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualquiera de las CDR de V_H de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de una,

dos, tres o más cualquiera de las CDR de V_L de un anticuerpo o fragmentos o variantes de los mismos, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En una realización, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las CDR de V_H o las CDR de V_L corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también están abarcadas por la invención.

Ejemplos de proteínas de fusión comunicados en la literatura incluyen fusiones del receptor de los linfocitos T (Gascoigne y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon y col., Nature 337 (1989), 525-531 ; Traunecker y col., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl y col., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353; y Bym y col., Nature 344 (1990), 667-670); L-selectina (receptor de localización) (Watson y col., J. Cell. Biol 110 (1990), 2221-2229; y Watson y col., Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo y col., Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley y col., J. Exp. Med. 173 (1991), 721- 730); CTLA-4 (Lisley y col., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic y col., Cell 66 (1991), 133-144); receptor del TNF (Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer y col., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; y Peppel y col., J. Exp. Med. 174 (1991),

1483-1489 (1991); y el receptor de IgE a (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), N° de resumen 1448).

Como se ha tratado en otro lugar en este documento, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos) de la invención se pueden fusionar a polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para usar en inmunoensayos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización se puede conjugar PEG con los anticuerpos de la invención para aumentar su semivida *in vivo*; véase, por ejemplo, Leong y col., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531 ; o Weir y col., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Además, los anticuerpos (p. ej., los anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos) de la invención se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar su purificación o detección. En realizaciones particulares, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina (HIS), tal como la marca proporcionada en un vector pQe (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en

Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación cómoda de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, a título enunciativo, el marcador de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., Cell 37 (1984), 767) y el marcador "flag".

Las proteínas de fusión se pueden preparar usando procedimientos bien conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.116.964 y 5.225.538. El sitio preciso en el que se realiza la fusión se puede seleccionar empíricamente para optimizar las características de secreción o de unión de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión se transfecta después a una célula huésped para su expresión.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una de diversas moléculas, por ejemplo para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana o para obtención de imágenes o terapia del paciente. Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos) de la invención se pueden marcar o conjugar antes o después de la purificación, cuando se realiza la

purificación. En particular, los anticuerpos de la invención se pueden conjugar con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

5 Los conjugados que son inmunotoxinas, incluyendo anticuerpos convencionales, se han descrito ampliamente en la técnica. Las toxinas se pueden acoplar a los anticuerpos mediante técnicas de acoplamiento convencionales o las inmunotoxinas que contienen porciones de la toxina proteica
10 se pueden producir como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la invención se pueden usar de un modo correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Ilustrativas de dichas inmunotoxinas son las descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y por Fanger, Immunol. Today 12 (1991).
15 51 -54.

Los expertos en la técnica apreciarán que los conjugados también se pueden ensamblar usando diversas técnicas dependiendo del agente seleccionado que se va a conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, por ejemplo,
20 mediante reacción de un polipéptido de unión a TDP-43 con un éster activado de biotina, tal como el éster N-hidroxisuccinimida de biotina. De un modo similar, se pueden preparar conjugados con un marcador fluorescente en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo los indicados en

este documento, o mediante reacción con un isotiocianato o fluoresceína-isotiocianato. Los conjugados de la invención se preparan de un modo análogo.

La invención también abarca anticuerpos (p. ej.,
5 anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y variantes o derivados de los mismos) de la invención conjugados con un agente diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos pueden usarse en diagnóstico para, por ejemplo, demostrar la presencia de una enfermedad
10 neurológica, para indicar el riesgo de contraer una enfermedad neurológica, para monitorizar el desarrollo o progresión de una enfermedad neurológica, es decir proteinopatía de TDP-43, como parte de un procedimiento de análisis clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de
15 un régimen de tratamiento y/o prevención dado. La detección se puede facilitar mediante acoplamiento del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos,
20 materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones que usan varias tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos: véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°

4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico de acuerdo con la invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, puntos cuánticos o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, también se pueden marcar de forma detectable mediante su acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con quimioluminiscencia se determina después detectando la presencia de luminiscencia que se produce durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos para marcaje quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio aromático, imidazol, sal de acridinio, y éster de oxalato.

Una de las formas en las que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo se puede marcar de forma detectable es uniéndolo a una enzima y usando el producto ligado en un inmunoensayo enzimático (EIA)

5 (Voller, A., 'The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)' Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1 -7); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), *Enzyme*

10 *Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. y col., (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kagaku Shoin, Tokio (1981). La enzima, que se une al anticuerpo, reaccionará con un sustrato adecuado, preferentemente un sustrato cromogénico, de un modo tal que produzca un resto químico que

15 se pueda detectar por medios, por ejemplo, espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que se pueden usar para marcar de forma detectable el anticuerpo incluye, a título enunciativo, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, delta-5-esteroide

20 isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y

acetilcolinesterasa. Además, la detección se puede realizar por procedimientos colorimétricos que usan un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede realizar mediante comparación visual de la extensión de la
5 reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de forma similar.

La detección también se puede realizar usando cualquiera de varios otros inmunoensayos. Por ejemplo, mediante marcaje radioactivo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno,
10 variante o derivado del mismo, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society (March, 1986)), que
15 se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. El isótopo radioactivo se puede detectar por medios, incluidos, a título enunciativo, un contador gamma, un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante
20 o derivado del mismo también se pueden marcar de forma detectable usando metales de emisión de fluorescencia, tales como ^{152}Eu , u otros del grupo de los lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo usando dichos grupos quelantes de metales como ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) o

ácido etileniaminotetraacético (EDTA).

Las técnicas para conjugar varios restos a un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo se conocen; véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col (eds) pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson y col. (eds), Marcel Dekker, Inc., pág. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents en Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col., (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. eds.), Academic Press pág. 303-16 (1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev*, 62 (1982), 119-158.

Como se ha mencionado, en determinadas realizaciones, se puede conjugar un resto que potencia la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, por ejemplo un polipéptido de unión, por ejemplo un anticuerpo o fragmento inmuno-específico del mismo. Por ejemplo, en una realización,

PEG se puede conjugar con las moléculas de unión de la invención para aumentar su semivida *in vivo*. Leong y col., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir y col., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

VI. Composiciones y procedimientos de uso

La invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión a TDP-43 mencionado anteriormente, por ejemplo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención o derivad o variante del mismo, o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la invención puede además comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otros agentes tales como interleucinas o interferones en función del uso previsto de la composición farmacéutica. Por ejemplo, para usar en el tratamiento de la proteinopatía de TP-43, el agente adicional se puede seleccionar del grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-TDP-43 y combinaciones de los mismos. Por tanto, en una realización particular, la invención se refiere al uso de la molécula de unión a TDP-43, por ejemplo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o de una molécula de unión que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de uno

cualquiera de los mismos, el polinucleótido, el vector o la célula de la invención para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una proteinopatía de TDP-43, monitorizar la
5 progresión de una proteinopatía de TDP-43 o una respuesta al tratamiento de una proteinopatía de TDP-43 en un sujeto o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una proteinopatía de TDP-43.

Por tanto, en una realización de la invención se refiere
10 a un procedimiento de tratamiento de un trastorno neurológico caracterizado por una acumulación y/o depósito anormales de TDP-43 en el cerebro y el sistema nervioso central, respectivamente, procedimiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz
15 de una cualquiera de las moléculas de unión a TDP-43, anticuerpos, polinucleótidos, vectores o células de esta invención descritos anteriormente. La expresión "proteinopatía de TDP-43" incluye, a título enunciativo, proteinopatías de TDP-43 tales como enfermedad por granos argirofílicos, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral
20 amiotrófica (ALS), complejo ALS-Parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal, Demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de las neuronas motoras, degeneración lobular

frontotemporal (FTLD), demencia frontotemporal, degeneración lobular frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina, esclerosis del hipocampo, miopatía con cuerpos de inclusión, miositis con cuerpos de inclusión, enfermedad de Parkinson, demencia por enfermedad de Parkinson, complejo Parkinson-demencia en la península de Kii y enfermedad de Pick, así como otros trastornos del movimiento, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades del sistema nervioso central (SNC) en general. A menos que se indique lo contrario, los términos neurodegenerativo, neurológico o neuropsiquiátrico se usan de forma intercambiable en este documento.

Una ventaja concreta del abordaje terapéutico de la invención reside en el hecho de que los anticuerpos de la invención derivan de linfocitos B o de linfocitos B de memoria de sujetos humanos sanos sin signo de ALS y/o FTLD y, por tanto, son, con una cierta probabilidad, capaz de prevenir proteinopatías de TDP-43 clínicamente manifiestas, o de disminuir el riesgo de aparición de la enfermedad clínicamente manifiesta o de retrasar el inicio de la enfermedad clínicamente manifiesta. Típicamente, los anticuerpos de la invención también han sufrido con éxito una maduración somática, es decir la optimización con respecto a la selectividad diana y eficacia en la unión de alta afinidad

por la molécula de TDP-43 diana por medio de variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

El conocimiento de que dichas células *in vivo*, por ejemplo en un ser humano, no se han activado por medios de proteínas fisiológicas relacionadas o de otro tipo o estructuras celulares en el sentido de una reacción autoinmunológica o alérgica también es de gran importancia, dado que esto significa una probabilidad considerablemente mayor de pasar por éxito por las fases de ensayo clínico. Por consiguiente, la eficiencia, la aceptabilidad y la tolerabilidad ya se han demostrado antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en al menos un sujeto humano. Por tanto, cabe esperar que los anticuerpos anti-TDP-43 humanos de la invención, tanto su eficiencia específica por la estructura diana como agente terapéutico como su menor probabilidad de producir efectos secundarios aumentan significativamente su probabilidad clínica de éxito.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico y diagnóstico, respectivamente, que comprenden uno o más contenedores cargados con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, por ejemplo anticuerpo anti-TDP-43, fragmento de unión, derivado o variante del mismo, polinucleótido, vector o célula de la invención.

Asociados con dicho(s) envase(s) puede adjuntarse una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, en la que se refleja la aprobación de la agencia de la fabricación, uso o venta del producto para administración en seres humano. Además o como alternativa, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para usar en ensayos diagnósticos adecuados. La composición, por ejemplo el kit de la invención es, por supuesto, particularmente adecuado para la evaluación del riesgo, diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno que se acompaña de la presencia de TDP-43 y, en particular, aplicable al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, proteinopatías de TDP-43, enfermedad por granos argirofílicos, enfermedad Alzheimer, Esclerosis lateral amiotrófica (ALS), complejo de demencia por ALS-parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de las neuronas motoras, degeneración lobular frontotemporal (FTLD), demencia frontotemporal, degeneración lobular frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina, esclerosis del hipocampo, miopatía con cuerpos de inclusión, miositis con cuerpos de inclusión, enfermedad de Parkinson, demencia por enfermedad de

Parkinson, complejo Parkinson-demencia en la península de Kii y enfermedad de Pick.

En una realización específica, la composición de la invención está en una solución acuosa estéril. En otra
5 realización, uno o más de los componentes de una composición de la invención se han liofilizado. En una realización adicional, la composición de la invención no contiene suero. En una realización adicional, uno o más anticuerpos contenidos en una composición de la invención se producen de
10 forma recombinante. En otra realización, la población de anticuerpos de la invención en la composición constituye al menos un 10% de la población de inmunoglobulina en la composición.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se
15 pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences In Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica
20 e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales. Estas

composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto como una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar por diferentes modos, por ejemplo mediante administración intravenosa, 5 intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Las formulaciones en aerosol, tales como formulaciones de pulverización nasal, incluyen soluciones acuosas purificadas o de otro tipo del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Dichas 10 formulaciones se ajustan a un pH y estado isotónico compatibles con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como supositorios con un vehículo adecuado.

Más particularmente, las composiciones farmacéuticas 15 adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En estos casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en 20 la medida que pueda cargarse en jeringuillas fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y, preferentemente, se conservará frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de

dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso
5 de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos.

Además, mientras que la invención incluye el ahora procedimiento estándar (aunque afortunadamente infrecuente)
10 de perforar un pequeño orificio en el cráneo para administrar un fármaco de la invención, en un aspecto, la molécula de unión, especialmente un anticuerpo o fármaco basado en el anticuerpo de la invención, puede atravesar la barrera hematoencefálica, que permite la administración intravenosa u
15 ora.

El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado de la atención y mediante factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluidos
20 el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto concreto que se va a administrar, el sexo, la hora y la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se estén administrando de forma concurrente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el

rango de 0,001 a 1.000 μg (o de ácido nucleico para expresión o para la inhibición de la expresión en este rango); no obstante, se conciben dosis inferiores o superiores a este intervalo de ejemplo, considerando especialmente los factores
5 anteriores. Generalmente, la dosis puede variar de, por ejemplo, aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (p. ej., 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser
10 de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1 a 10 mg/kg, o al menos de 1 mg/kg. Las dosis intermedias en los rangos anteriores también se pretende que entren dentro del alcance de la invención. Se puede administrar a los sujetos estas dosis diarias, en días
15 alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo abarca la administración en múltiples dosificaciones durante un periodo prolongado, por ejemplo de al menos seis meses. Ejemplos de regímenes de tratamiento
20 adicionales abarcan la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada de 3 a 6 meses. Ejemplos de pautas posológicas incluyen de 1 a 10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanales. En algunos procedimientos, se administran de

forma simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes afinidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado entra dentro de los intervalos indicados. El progreso se puede monitorizar
5 mediante evaluación periódica.

Para la administración parenteral, las preparaciones incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales
10 como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, todas incluyendo medios salinos y tamponados. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de
15 Ringer, cloruro sódico y dextrosa, Ringer lactato o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluido y de nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como,
20 por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otros agentes tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, en función del uso previsto de la composición farmacéutica.

Además, en una realización concreta de la invención, la composición farmacéutica se puede formular como una vacuna, por ejemplo si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti-TDP o fragmento de unión, derivado o variante del mismo para inmunización pasiva. Es prudente esperar que los anticuerpos anti-TDP43 humanos y moléculas de unión a TDP43 equivalentes de la invención son particularmente útiles como vacuna para la prevención o mejora de proteinopatías de TDP-43 tales como esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad por granos argirofílicos, enfermedad de Alzheimer, complejo de demencia por Parkinsonismo-ALS de Guam, degeneración corticobasal, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de las neuronas motoras, degeneración lobular frontotemporal (FTLD), demencia frontotemporal, degeneración lobular frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina, esclerosis del hipocampo, miopatía con cuerpos de inclusión, miositis con cuerpos de inclusión, enfermedad de Parkinson, demencia por enfermedad de Parkinson, complejo Parkinson-demencia en la península de Kii, enfermedad de Pick, enfermedad de Machado-Joseph y similares.

En una realización, puede ser beneficioso usar Fab recombinante (rFab) y fragmentos monocatenarios (scFv) del

anticuerpo de la invención, que podrían atravesar más fácilmente la membrana celular. Por ejemplo, , Robert y col., Protein Eng. Des. Sel. (2008) Oct 16; S1741 -0134, publicado online con antelación, describen el uso de Fab recombinante (rFab) quimérico y fragmentos monocatenarios (scFv) del anticuerpo monoclonal WO-2 que reconoce un epítipo en una región N-terminal de A β . Los fragmentos modificados por ingeniería pudieron (i) prevenir la fibrilación amiloide, (ii) disgregar las fibrillas A β 1-42 preformadas y (iii) inhibir la neurotoxicidad mediada por el oligómero A β 1-42 *in vitro* de un modo tan eficiente como la molécula de IgG entera. Las ventajas percibidas del uso de pequeños formatos de anticuerpos modificados por ingeniería Fab y sc-Fv que carecen de la función efectora incluyen un paso más eficiente a través de la barrera hematoencefálica y minimizar el riesgo de desencadenar reacciones secundarias inflamatorias. Además, además de que los fragmentos scFv y los anticuerpos de un solo dominio retienen la especificidad de unión de los anticuerpos de longitud completa, se puede expresar como genes únicos e intracelularmente en células de mamífero como intracuerpos, con el potencial de alteración del plegamiento, interacciones, modificaciones o localización subcelular de sus dianas; véase, para una revisión, por ejemplo, Miller y Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394-401.

En un abordaje diferente, Muller y col., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241, describen una plataforma de tecnología, la denominada "Tecnología del Superanticuerpo", que se dice que permite lanzar a los anticuerpos al interior
5 de las células vivas sin dañarlos. Dichos anticuerpos que penetran en las células abren nuevas ventanas diagnósticas y terapéuticas. Para estos anticuerpos se ha acuñado el término "TransMabs".

En una realización adicional, puede ser deseable la
10 coadministración o administración secuencial de otros agentes neuroprotectores útiles para tratar una proteinopatía de TDP-43. En una realización, el agente adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la invención. Ejemplos de agentes neuroprotectores que se pueden usar para tratar a un
15 sujeto incluyen, entre otros, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, un antagonista del receptor glutaminérgico, inhibidores de las quinasas, inhibidores de HDAC, agentes antiinflamatorios, divalproex sódico o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de otros
20 agentes neuroprotectores que se pueden usar junto con la composición farmacéutica de la invención se describen en la técnica; véase, por ejemplo, la publicación de solicitud internacional nº WO2007/01 1907. En una realización, el agente adicional es dopamina o un agonista del receptor de

dopamina.

Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del ingrediente activo suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población). La proporción de la dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción entre la DL_{50} y la DE_{50} . En una realización, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para restaurar y conservar el comportamiento y/o las propiedades cognitivas normales en el caso de la ALS y/o la FTLD u otras proteinopatías de TDP-43.

A partir de lo anterior es obvio que la invención abarca cualquier uso de una molécula de unión a TDP-43 que comprende al menos una CDR del anticuerpo descrito anteriormente, en particular para el diagnóstico y/o tratamiento de una proteinopatía de TDP-43 como se ha mencionado anteriormente, en particular esclerosis lateral amiotrófica y/o degeneración lobular frontotemporal. En una realización, dicha molécula de unión es un anticuerpo de la invención o una cadena de

inmunoglobulina del mismo. Además, la invención se refiere a anticuerpos antiidiotípicos de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados descritos anteriormente en este documento. Los anticuerpos antiidiotípicos son anticuerpos u
5 otras moléculas de unión que se unen a la secuencia peptídica antigénica única localizada en la región variable del anticuerpo cerca del sitio de unión al antígeno y son útiles para, por ejemplo, la detección de anticuerpos anti-TDP-43 en una muestra de un sujeto.

10 En otra realización, la invención se refiere a una composición diagnóstica que comprende una cualquiera de las moléculas de unión a TDP-43 descritas anteriormente, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, polinucleótidos, vectores o células de la invención y opcionalmente medios
15 adecuados para detección, tales como reactivos usados convencionalmente en procedimientos diagnósticos basados en ácido nucleico. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, adecuados para usar en inmunoensayos en los que se pueden usar en fase líquida o unidos a un vehículo en fase
20 sólida. Ejemplos de inmunoensayos que pueden usar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Ejemplos de estos inmunoensayos son radioinmunoensayo (RIA), ensayo de tipo sándwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y

ensayo de transferencia de tipo western. Los antígenos y anticuerpos de la invención pueden estar unidos a muchos vehículos diferentes y usarse para aislar las células unidas específicamente. Ejemplos de vehículos conocidos incluyen

5 vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Existen muchos

10 marcadores y procedimientos de marcaje diferentes conocidos para los expertos en la técnica. Ejemplos de los tipos de marcadores que se pueden usar en la invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos

15 bioluminiscentes; véase también las realizaciones tratadas anteriormente en este documento.

Mediante una realización adicional, las moléculas de unión a TDP-43, en particular los anticuerpos de la invención, también se pueden usar en un procedimiento para el

20 diagnóstico de un trastorno en un individuo obteniendo una muestra de fluido corporal del individuo analizado y poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de esta invención en condiciones que permitan la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El nivel de estos complejos se

determina después mediante procedimientos conocidos en la técnica, un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra control es indicativo de enfermedad en el individuo analizado. Del mismo modo, también se puede usar el
5 antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención. Por tanto, la invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, por ejemplo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

10 En este contexto, la invención también se refiere a medios diseñados específicamente para este fin. Por ejemplo, se puede usar una matriz basada en anticuerpos que, por ejemplo, se carga con anticuerpos o moléculas de unión a antígeno equivalentes de la invención, que reconocen
15 específicamente TDP-43. El diseño de inmunoensayos en micromatrices se resume en Kusnezovv y col., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696. De acuerdo con lo anterior, la invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de unión a TDP-43 identificadas de acuerdo con la
20 invención.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de una proteinopatía de TDP-43 en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

(a) evaluar el nivel de TDP-43 en una muestra del sujeto

a diagnosticar con un anticuerpo de la invención, un
fragmento de unión a TDP-43 del mismo o una molécula
de unión a TDP-43 que tienen sustancialmente las
mismas especificidades de unión de uno cualquiera de
5 los mismos; y

(b) comparar el nivel de la TDP-43 con un patrón de
referencia que indique el nivel de la TDP-43 en uno o
más sujetos control,
en el que una diferencia o similitud entre el nivel de
10 TDP-43 y el patrón estándar indica que el sujeto sufre
una proteinopatía de TPD-43.

El sujeto que se va a diagnosticar puede estar
asintomático o preclínico para la enfermedad. En una
realización, el sujeto control tiene una proteinopatía de
15 TPD-43, por ejemplo ALS o FTLD, en la que una similitud entre
el nivel de TPD-43 y el patrón de referencia indica que el
sujeto a diagnosticar sufre una TPD-43. Como alternativa, o
además, como segundo control, el sujeto no tiene una
proteinopatía de TPD-43, en la que una diferencia entre el
20 nivel de TPD-43 y el patrón de referencia indica que el
sujeto a diagnosticar sufre una TPD-43. I, el sujeto a
diagnosticar y el o los sujetos control tienen la misma edad.
La muestra que se va a analizar puede ser cualquier fluido
corporal que se sospeche que contiene TDP-43, por ejemplo una

muestra de sangre, LCR u orina.

El nivel de TDP-43 se puede evaluar por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica que comprende, por ejemplo, analizar la TDP-43 mediante una o más técnicas
5 elegidas de transferencia de tipo western, inmunoprecipitación, ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel bidimensional, espectroscopia de masas (MS), MS por
10 desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), desorción/ionización láser potenciada por superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de líquidos rápida de proteínas (FPLC), cromatografía de
15 líquidos multidimensional (LC) seguida de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y densitometría láser. En una realización, dicha obtención de imágenes *in vivo* de TDP-43 comprende tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón único (SPECT), obtención de
20 imágenes ópticas en infrarrojo cercano (NIR) u obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).

Los procedimientos de diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa, tal como AD, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy o FTLD

para monitorizar la progresión de una proteinopatía de TDP-43
y monitorizar un tratamiento de una proteinopatía de TDP-43
usando anticuerpos y medios relacionados que se pueden
adaptar de acuerdo con la invención también se describen en
5 las publicaciones de solicitud internacional N° WO2010/111587
y WO2007/011907, que se incorporan en este documento por
referencia en su totalidad. Dichos procedimientos se pueden
aplicar como se ha descrito pero con un anticuerpo específico
de TDP-43, fragmento de unión, derivado o variante de la
10 invención.

Estas y otras realizaciones se divulgan y abarcan en la
descripción y ejemplos de la invención. Más literatura
concerniente a uno cualquiera de los materiales,
procedimientos, usos y compuestos que se van a usar de
15 acuerdo con la invención se puede recuperar de bibliotecas
públicas y bases de datos usando, por ejemplo, dispositivos
electrónicos. Por ejemplo, se puede usar la base de datos
pública "Medline", que está alojada en el National Center for
Biotechnology Information y/o la the National Library of
20 Medicine en los National Institutes of Health. Otras bases de
datos y direcciones web, como los del European Bioinformatics
Institute (EBI), que forma parte del European Molecular
Biology Laboratory (EMBL), son conocidas para los expertos en
la técnica y también se pueden obtener usando motores de

búsqueda en internet. Una revisión de la información sobre patentes en biotecnología y una investigación de fuentes relevantes de información sobre patentes útil para búsquedas retrospectivas y para los conocimientos actuales se
5 proporciona en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

Generalmente, la divulgación anterior describe la invención. A menos que se indique lo contrario, se proporciona la definición de un término como se usa en este documento según el Oxford Dictionary of Biochemistry and
10 Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpresso en 2003, ISBN 0 19 850673 2. A lo largo del texto de esta memoria se citan varios documentos. Las citas bibliográficas completas se pueden encontrar al final de la memoria, inmediatamente antes de las reivindicaciones. Los
15 contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo las referencia bibliográficas, las patentes expedidas, las solicitudes de patentes publicadas como se citan en esta solicitud y las especificaciones, instrucciones etc. del fabricante) se incorporan en este documento por referencia en
20 su totalidad; no obstante, no hay admisión alguna de que cualquiera de los documentos citados sea, de hecho, técnica anterior en lo referente a la invención.

Un entendimiento más completo se puede obtener por referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se

proporcionan en este documento únicamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el ámbito de la invención.

EJEMPLOS

5 **Materiales y procedimientos**

Descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los usados en este documento, se pueden encontrar en la bibliografía citada. A menos que se indique lo contrario más adelante, la identificación de linfocitos B específicos de TDP-43 y la clonación molecular de anticuerpos frente a TDP-43 que muestren especificidad de interés, así como su expresión recombinante y caracterización funcional se han realizado o se pueden realizar como se describe en los ejemplos y en la sección Procedimientos complementarios de la solicitud internacional PCT/EP2008/000053 publicada como WO2008/081008, cada uno de los cuales se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

Anticuerpo frente a TDP-43 humano

20 **ELISA**

Microplacas con semiárea de 96 pocillos (Corning) se revistieron con:

- (a) TDP-43 humano recombinante de longitud completa marcado con His(Biogen Idec, EE.UU.);

o

(b) un péptido sintético que consiste en los residuos 390-414 del dominio en C-terminal de TDP-43 con modificación por fosforilación en los residuos 409 y 410 (Shafer-N, DK)

a una concentración de 5 µg/ml y 3,3 µg/ml, respectivamente, en tampón de recubrimiento de carbonato para ELISA (pH 9,6) durante la noche a 4° C.

Las placas se lavaron en PBS-Tween (pH 7,6) y los sitios no específicos se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS-T que contenía 2% de BSA (Sigma, Buchs, Suiza). EL medio acondicionado para linfocitos B se transfirió desde las placas de cultivo de linfocitos B de memoria a placas de ELISA y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas de ELISA se lavaron en PBS-T y después se incubaron con anticuerpos policlonales inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson Immuno Research, EE.UU.). Después de lavar con PBS-T, la unión de los anticuerpos humanos se determinó mediante la medición de la actividad de la HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

MSD

Las placas de 10 puntos de 96 pocillos MULTI-SPOT (Meso

Scale Discovery, EE.UU.) se revistieron con una mezcla de fragmentos proteicos de TDP-43 correspondientes a los aminoácidos 1 -259, 260 a 277 y 350-366 (Abeampic, Reino Unido), respectivamente. Se usaron 10 µg/ml de cada péptido y se formularon en PBS. Los sitios de unión no específica se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS-T que contiene 3% de BSA, seguido de incubación con medio acondicionado para linfocitos B durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron en PBS-T y después se incubaron con anticuerpo policlonal anti-humano conjugado con SULFO-Tag (Mesoscale Discovery, EE.UU.). Después de lavar con PBS-T, el anticuerpo unido se detectó mediante medición con electroquimioluminiscencia usando un SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery, EE.UU.).

15 **Clonación molecular de anticuerpos frente a TDP-43 humanos**

Las muestras que contenían los linfocitos B de memoria se obtuvieron de sujetos humanos sanos. Los linfocitos B de los cultivos de linfocitos B de memoria seleccionados se recogieron. El ARNm se aisló y el ADNc se preparó mediante transcriptasa inversa (Clontech, EE.UU.). Las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina se obtuvieron después usando un abordaje de PCR anidada.

Una combinación de cebadores que representan todas las familias de secuencias del repertorio de la línea germinal de

inmunoglobulinas humanas se usa para las amplificaciones de los péptidos líder, segmentos V t segmentos J. La primera amplificación se realiza usando cebadores específicos de los péptidos líder en el extremo 5' y cebadores específicos de la región constante en el extremo 3' (Smith y col., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384). Para las cadenas pesadas y las cadenas ligeras kappa, la segunda ronda de amplificación se realiza usando cebadores específicos del segmento V en el extremo 5' y cebadores específicos del segmento J en el extremo 3'. Para las cadenas ligeras lambda, la segunda ronda de amplificación se realiza usando cebadores específicos del segmento V en el extremo 5' y un cebador específico de la región C en el extremo 3' (Marks y col., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597: de Haard y col., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218- 18230).

La identificación del clon del anticuerpo con la especificidad deseada se realiza mediante una nueva detección selectiva en ELISA con la expresión recombinante de anticuerpos completos. La expresión recombinante de anticuerpos IgG1 humanos completos o anticuerpos IgG2a quiméricos se consigue tras la inserción de las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera "en el correcto marco de lectura" en los vectores de expresión que complementan la secuencia de la región variable con una secuencia que codifica un péptido líder en el extremo 5' y

con una secuencia que codifica el o los dominios constantes adecuados en el extremo 3'- Con este fin, los cebadores contenían sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera en vectores de expresión de anticuerpos. Las inmunoglobulinas de cadena pesada se expresan insertando el producto de la RT-PCR de la cadena pesada de la inmunoglobulina en el marco dentro de un vector de expresión de la cadena pesada portador de un péptido señal y los dominios constantes de la inmunoglobulina gamma 1 humana la inmunoglobulina gamma 2a de ratón. Las inmunoglobulinas de cadena ligera kappa se expresan insertando el producto de la RT-PCR de la cadena ligera kappa de en el marco dentro de un vector de expresión de la cadena ligera que proporcione un péptido señal y el dominio constante de la inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana. Las inmunoglobulinas de cadena ligera gamma se expresan insertando el producto de la RT-PCR de la cadena ligera gamma de en el marco dentro de un vector de expresión de la cadena ligera lambda que proporcione un péptido señal y el dominio constante de la inmunoglobulina de cadena ligera lambda humana o de ratón.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales se obtienen tras la co-transfección en células HEK293 o CHO

(o cualquier otra línea celular receptora adecuada de origen humano o de ratón) de un vector de expresión de Ig-cadena pesada y un vector de expresión de Ig-cadena ligera kappa o lambda. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se purifica después del medio acondicionado usando una purificación en columna de proteína A estándar. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se puede producir en cantidades ilimitadas usando células transfectadas de forma transitoria o estable. Las líneas celulares productoras de anticuerpo monoclonal humano se pueden establecer usando los vectores de expresión de Ig directamente o mediante reclonación de las regiones variables de Ig en diferentes vectores de expresión. Los derivados, tales como F(ab), F(ab)₂ y scFv, también se pueden generar a partir de estas regiones variables de Ig.

Purificación y caracterización de TDP-43 marcado con His

Un vector de expresión para la TDP-43 marcada con 6XHis (pCGB026) se generó clonando la secuencia de TDP-43 en el vector de expresión pRSET A (Invitrogen). Células BL21 Star (DE3)pLysS de *E. coli* (Invitrogen) se transformaron con pCGB026. Tras el crecimiento a 37 °C hasta aproximadamente 1 DO en un matraz de agitación de 1 l que contiene caldo LB, se añadió IPTG hasta 0,5 mM y las células se cultivaron durante la noche a 18°C. Las células se sedimentaron mediante

centrifugación a baja velocidad, se decantó el sobrenadante y los sedimentos celulares se congelaron para almacenar a -20°C.

Los sedimentos celulares se equilibraron hasta la
5 temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, imidazol 20 mM, NaCl 150 mM, que contiene inhibidores de la proteasa (IP) (concentración de IP: PMSF 1 mM, pepstatina A 5 µM, benzamida 1 mM, besiatina 10 µM, E64 10 µM, leupeptina 20 µM, aprotinina 1,5 µM). Tras la
10 homogeneización durante 5 minutos para romper las partículas grandes las células se rompieron a presión alta usando un microfluidificador (Microfluidics, Inc.). El lisado celular se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 rpm a 4°C. El sedimento, que contenía TDP-43 marcada con his insoluble, se
15 resuspendió en 5 ml de solución B-PER (Thermo Scientific) que contenía MgCl₂ 2 mM, pastillas de EDTA completo sin PI (Roche), 100 µg/ml de lisozima, 5 U/ml de DNasa (Thermo Scientific) t se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadió una solución adicional de comprimidos de
20 B-PER/MgCl₂ 2 mM /PI hasta un volñumen final de 50 ml y la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm. El sedimento aislado se lavó dos veces en 20 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, imidazol NaCl 150 mM, tampón PI, seguido de centrifugación durante 10 minutos a 10.000 rpm. El sedimento

aislado se resuspendió después en urea 8M, fosfato sódico 20 mM, a pH 7,8, con PI, mezclado durante 5 minutos mediante homogeneización y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos.

5 El sobrenadante se aisló, se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m, se combinó con 4 ml de resina Ni-NTA (Invitrogen) equilibrada en urea 8M, fosfato sódico 20 mM a pH 7,8, NaCl 0,5M con PI, y se incubó en agitación durante la noche a 4 °C. Se recolectó el flujo continuo y la resina se
10 lavó con 10 volúmenes de columna de urea 8M, fosfato sódico 20 mM a pH 5,3, NaCl 0,5M. La TDP-43 marcada con his se eluyó en fracciones de 0,5 volúmenes de columna con urea 8M, fosfato sódico 20 mM a pH 4 cloruro sódico 0,5M. Las fracciones pico se combinaron y se determinó la concentración
15 proteica usando espectrometría UV. El rendimiento total purificado fue ~ 8 mg/l de cultivo.

El análisis SDS-PAGE de la proteína purificada mostró una banda principal en ~ 47 kDa (datos no proporcionados) consistente con la masa molecular predicha de 46,5 kDa. La
20 espectrometría de masas intacta sobre la proteína purificada indicó un pico principal a 46538 Da, consistente con la masa predicha de 46529,9 Da. La capacidad de los anticuerpos disponibles comercialmente conocidos contra TDP-43 para unirse a la proteína purificada se determinó mediante ELISA.

El anticuerpo monoclonal de ratón 2E2-D3, que reconoce los aminoácidos 205-222 (Zhang, H.-X, y col., 2008, Neuroscience Lett., 434, 170-74), y los anticuerpos policlonales de conejo A260 y G400, que reconocen secuencias alrededor de los aminoácidos Ala-260 y Gly-400, respectivamente, se unieron todos a la TDP-43 marcada con His purificada (datos no proporcionados)

Expresión recombinante de dominios de TDP-43 humanos

Las secuencias que codifican el dominio de TDP-43 humano se amplificaron mediante PCR de la secuencia de ADNc de longitud completa (Q13 148, TARBP_HUMAN) y se clonaron en el vector de expresión pRSET-A (Invitrogen, EE.UU.). Los cuatro vectores de expresión (dominio I His-huTDP-43, dominio II His-huTDP-43, dominio III His-huTDP-43 y dominio IV His-huTDP-43) codifican los cuatro dominios de TDP-43: el dominio en N-terminal (residuos de aminoácidos 2-106 de la SEC ID N° 94), el dominio 1 de unión a ARN (resduos de aminoácidos 99-204 de la SEC ID N° 94), el dominio 2 de unión a ARN (residuos de aminoácidos 183-273 de la SEC ID N° 94) y el dominio rico en glicina (residuos de aminoácidos 258-414 de la SEC ID N° 94), respectivamente. Las construcciones de ADN que comprenden el ADNc que codifican los dominios de TDP-43 bajo el control del promotor de T7 se usaron para transformar una cepa de *Escherichia coli* adecuada, tal como BL21 (DE3)

(New England Biolabs, EE.UU.) y la expresión de 15 ml de cultivo celular se indujo mediante la adición de β -D-tiogalactopiranosido isopropilo (IPTG) 0,5 mM. Las células se recogieron después de 4 horas de inducción a 37° C y después se resuspendieron en 1 ml de KCl 100 mM, HEPES 50 mM, EGTA 2 mM, MgCl₂ 1 mM, ditioneitol 1 mM, PMSF 0,1 mM , 10 % de glicerol y 0,1 mg/ml de lisozima, a pH 7,5, seguido de sonicación. Las fracciones solubles e insolubles se recogieron tras la centrifugación a 9.000 rpm a 4 °C durante 45 minutos. De forma similar, se recogieron 9.000 g de sobrenadante de *Escherichia coli* simulada. Cuando se requirió (dominio IV de TDP-43), la fracción insoluble se solubilizó en 1 ml de urea 8M, Tris 20 mM, KCl 200 mM y β -mercaptoetanol 1 mM Las fracciones solubles e insolubles se cargaron en columnas de supeflujo Ni-NTA (Qiagen, EE.UU.) y los dominios His-TDP-43 se purificaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El grado de pureza de las proteínas recombinantes se estimó mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie. La concentración de las proteínas purificadas se determinó mediante medición de la absorbancia a 280 nM.

ELISA directo

Microplacas de 96 pocillos (Corning) se revistieron con TDP-43, dominio I de TDP-43 (residuos de aminoácidos 2-106 de la SEC ID N° 94), dominio II de TDP-43 (residuos de

aminoácidos 99-204 de la SEC ID N° 94), dominio III de TDP-43 (residuos de aminoácidos 183-273 de la SEC ID N° 94), dominio IV de TDP-43 (residuos de aminoácidos 258-414 de la SEC ID N° 94) o con un péptido sintético que cubre los
5 residuos 390 a 414 del dominio en C-terminal de TDP-43 (véase la SEC ID N° 94) con modificación de fosforilación en los residuos 409/410 (Schafer-N, DK) diluidos a una concentración de 6,6 µg/ml o 3,3 µg/ml, respectivamente, en tampón de recubrimiento de carbonato para ELISA (pH 9,6) durante la
10 noche a 4° C. Los sitios de unión no específica se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBST que contenía 2 % de BSA (Sigma, Buchs, Suiza). Los anticuerpos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión se de terminó usando un anticuerpo específico de IgG γ anti-humano de burro
15 conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.) o un anticuerpo secundario específico de (H+L) IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.), seguido de medición de la actividad de la HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

20 **Análisis de transferencia de tipo Western**

La TDP-43 recombinante de longitud completa, el dominio I de TDP-43 (residuos de aminoácidos 2-106 de la SEC ID N° 94), dominio II de TDP-43 (residuos de aminoácidos 99-204 de la SEC ID N° 94), el dominio III de TDP-43 (residuos de

aminoácidos 183-273 de la SEC ID N° 94), el dominio IV de TDP-43 (residuos de aminoácidos 258-414 de la SEC ID N° 94), 300 ng de cada uno, se resolvieron mediante SDS-PAGE (NuPAGE 12 % Bis-Tris Gel; Invitrogen, Basilea, Suiza), seguido de electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa. Las sitios de unión no específica se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBST que contenía 2% de BSA (Sigma, Buchs, Suiza). Las transferencias se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios (10 nM), seguido de anticuerpo secundario específico de IgG γ anti-humano de burro conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.) o anticuerpo secundario específico de (H+L) IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.). Las transferencias se desarrollaron usando detección ECL y ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza).

Tarea del laberinto Y de dos pruebas

La mejora de la memoria de trabajo en el modelo de ratón con proteinopatía de TDP-43 tratado con anticuerpos se puede analizar usando una tarea del laberinto Y de dos pruebas (p. ej., Penanen, Genes Brain Behav. 5 (2006), 369-79, que se incorpora en su totalidad por referencia. Las tres ramas del laberinto tienen una longitud de 22 cm, una anchura de 5 cm y una profundidad de 15 cm. Se colocan pistas abstractas blancas y negras en una cortina negra rodeando al laberinto.

Los experimentos se realizan con un nivel de luz ambiental de 6 lux durante la fase de oscuridad. Cada experimento comprende una sesión de entrenamiento y una sesión de observación. Durante la sesión de entrenamiento se asigna a un ratón a dos de las tres ramas (la rama de inicio y la segunda rama), que puede explorar con libertad durante 4 minutos sin acceso a la tercera rama (la rama nueva). Después, se saca al ratón del laberinto y se mantiene en una jaula de retención durante 1,5 - 5 min, mientras se limpia el laberinto completamente con 70% de etanol para eliminar cualquier pista para el olfato. Después, se introduce de nuevo al ratón en el laberinto para observación con las tres ramas accesibles durante 4 minutos. Se registra la secuencia de entradas, el número de entradas en cada rama y el tiempo que ha pasado en cada rama. A partir de esto se calcula la proporción de tiempo pasado en la nueva rama tercera durante la media de tiempo pasado en las otras dos ramas (rama de inicio y segunda rama) y se compara entre los diferentes grupos de tratamiento en el modelo de ratón de tauopatía y el correspondiente control con ratones salvajes. Típicamente, los roedores prefieren investigar una nueva rama del laberinto en lugar de volver a una que ya han visitado previamente. Los efectos de los anticuerpos se pueden monitorizar con respecto a la conservación de esta

preferencia por los ratones del modelo de proteionopatía de TDP-43 tratados en comparación con el comportamiento no discriminatorio de los ratones sin tratar debido a su alteración de la memoria de trabajo relacionada con el

5 trastorno. Por tanto, una proporción cercana a 1 indica alteración de la memoria de trabajo. Una proporción mayor indica mejor memoria de trabajo. La memoria de trabajo alterada en un modelo de proteinopatía de TDP-43 se considera debida a una patología de TDP-43 resultante de la

10 sobreexpresión de TDP-43 humana. Por tanto, una proporción significativamente mayor observada en ratones tratados con el anticuerpo anti-TDP-43 con respecto a los ratones control indicará que el anticuerpo anti-TDP-43 tiene un efecto terapéutico sobre la patología de TDP-43.

15 **Ensayo de poste**

Los ratones se analizan al principio de la fase de oscuridad cuando están más activos. El poste está hecho de una barra de madera con una longitud de 50 cm y una anchura de 1 cm cubierto con un paño para facilitar la escalada. La

20 base del poste se coloca en la jaula del ratón. El ratón se coloca encima del poste y el tiempo que tarda en orientarse hacia abajo y el tiempo que tarda en bajar a la jaula se registran en 5 ensayos con intervalos entre los ensayos de 30 minutos. Se analiza el ensayo que arrojó mejor rendimiento.

Ensayo del laberinto elevado

Los ratones se analizan al principio de la fase de oscuridad cuando están más activos. El ensayo se realiza en luz tenue (40 lux). El laberinto plus elevado consta de os
 5 ramas abiertas y dos ramas cerradas (longitud de la rama: 30 cm; anchura: 5 cm). Las ramas abiertas tienen un pequeño borde de 1 cm y las ramas cerradas están bordeadas por una pared de 15 cm. Al principio de la tarea, se coloca a los ratones en el centro de un laberinto elevado frente a una
 10 rama abierta. Se graba a los ratones mientras exploran el laberinto durante 5 minutos. El tiempo que pasan en las ramas abiertas y cerradas y la distancia que recorren se mide y se analiza.

15 Ejemplo 1: Análisis de unión al anticuerpo frente a TDP-43 humano mediante ELISA y transferencia de tipo Western

ELISA directo

Microplacas de 96 pocillos (Corning) se revistieron con polipéptidos que comprenden los residuos de aminoácidos de
 20 TDP-43 2-106 de la SEC ID N° 94, (dominio I de TDP-43 (residuos de aminoácidos 99-204 de la SEC ID N° 94, (dominio II de TDP-43 (residuos de aminoácidos 183-273 de la SEC ID N° 94, (dominio III de TDP-43 (residuos de aminoácidos 258-414 de la SEC ID N° 94, (dominio IV de TDP-43 (residuos de

aminoácidos 2-414 de la SEC ID N° 94 (TDP-43 de longitud completa) y un polipéptido sintético que contiene los residuos 390-414 con modificación de fosforilación en los residuos 409/410 de la SEC ID N° 94. Los polipéptidos
5 revistieron las placas de ELISA a una concentración de revestimiento igual de 6,6 µg/ml (TDP-43 recombinante y fragmentos de TDP-43) o 3,3 µg/ml (péptidos sintéticos). La unión de los anticuerpos derivados de humanos se determinó mediante ELISA directo.

10 Los anticuerpos NI-205.51C1 (Fig. 2A) y NI-205.3F10 (Fig. 2C) se unieron específicamente al dominio III de TDP-43 (residuos de aminoácidos 183-273 de la SEC ID N° 94). Los anticuerpos NI-205.8A2 (Fig. 2D), NI-205.15F12 (Fig. 2E), NI-205.25F3 (Fig. 2G) y NI- 205.2 1G1 (Fig. 2I) se unieron
15 específicamente al dominio IV de TDP-43 (residuos de aminoácidos 258-414 de la SEC ID N° 94). El anticuerpo NI-205.87E7 (Fig. 2H) se unió específicamente al dominio I de TDP-43 (residuos de aminoácidos 2-106 de la SEC ID N° 94). Los anticuerpos NI-205.21G2 (Fig. 2B) y NI-205.1 13C4 (Fig.
20 2F) se unieron específicamente al dominio II de TDP-43 (residuos de aminoácidos 99-204 de la SEC ID N° 94). Todos los anticuerpos específicos de TDP-43 derivados de ser humano reconocían específicamente la TDP-43 de longitud completa. Para controlar la eficiencia del revestimiento de los

diferentes dominios de TDP-43 se usaron los anticuerpos disponibles comercialmente que se unen a TDP-43 de longitud completa y un dominio de TDP-43 específico: Ab50930 (Abcam, Reino Unido), dominio 1 de TDP-43 ; anticuerpo monoclonal
5 TARDBP (M01), clon 2E2-D3 (Abnova, Taiwán), dominio III de TDP-43 y Ab82695 (Abcam, EE.UU.), dominio IV de TDP-43. Los anticuerpos control se unieron a la TDP-43 de longitud completa y a su dominio de TDP-43 específico.

Unión a distintos dominios de TDP-43 mediante transferencia 10 de tipo western

La TDP-43 recombinante de longitud completa, el dominio I de TDP-43 (residuos de aminoácidos 2-106 de la SEC ID N° 94), dominio II de TDP-43 (residuos de aminoácidos 99-204 de la SEC ID N° 94), el dominio III de TDP-43 (residuos de
15 aminoácidos 183-273 de la SEC ID N° 94) y el dominio IV de TDP-43 (residuos de aminoácidos 258-414 de la SEC ID N° 94) se resolvieron mediante SDS-PAGE. EL anticuerpo específico de TDP-43 disponible comercialmente TARDBP (M01), clon 2E2-D3 (Abnova, Taiwán) se usaron como control positivo para la
20 detección de TDP-43, mientras que un anticuerpo específico de Fc γ de IgG anti-humano se usó como control negativo. La unión de los anticuerpos derivados de humanos A dominios de TDP-43 específicos se determinó mediante análisis de tipo Western.

La transferencia de tipo western indicó que los anticuerpos: (a) los anticuerpos NI-205.51C1 y NI-205.3F10 se unieron específicamente al dominio III de TDP-43 (residuos de aminoácidos 183-273 de la SEC ID N° 94) (b) los anticuerpos NI-205.8A2 y NI-205.21G1 se unieron específicamente al dominio IV de TDP-43 (residuos de aminoácidos 258-414 de la SEC ID N° 94); (c) NI-205.21G2 reconoció específicamente el dominio II de TDP-43 (residuos de aminoácidos 99-204 de la SEC ID N° 94); (d) NI-205.51C1, NI-205.3F10, NI-205.8A2, NI-205.21G1, NI-205.21G2 reconoció la TDP-43 humana de longitud completa además de un dominio de TDP-43; y (e) los anticuerpos derivados de ser humano NI-205.25F3, NI-205.15F12 y NI-205.87E7 reconocieron la TDP-43 de longitud completa pero no parecían unirse a un dominio específico de TDP-43 (datos no proporcionados). Además, los anticuerpos NI-205.68G5 y NI-205.20A1, que preferentemente o exclusivamente se unían al péptido en C-terminal fosfo-TDP-43 (véase el ejemplo 2) no parecían reconocer la TDP-43 recombinante de longitud completa ni ninguno de sus fragmentos (datos no proporcionados).

Ejemplo 2: Determinación de la CE₅₀ para los anticuerpos de unión a TDP-43

Determinación de la concentración semimáxima eficaz (CE₅₀)

Para determinar la concentración semimáxima (CE₅₀) eficaz

de los anticuerpos específicos de TDP-43 derivados de ser humano por la TDP-43 humana y para evaluar la especificidad por la diana, se revistieron microplacas de 96 pocillos (Corning) con TDP-43 de longitud completa recombinante (Biogen Idec, EE.UU.), extracto de *Escherichia coli* y BSA (Sigma, Buchs, Suiza), diluido a una concentración de 5 µg/ml en tampón de revestimiento de carbonato para ELISA (pH 9,6) durante la noche a 4° C. Como alternativa, microplacas de semiárea de 96 pocillos (Corning) revistieron con un péptido sintético que cubre los residuos de 390 a 414 del dominio en C-terminal de TDP-43 con modificación por fosforilación en los residuos 409/410 (Schafer-N, DK) y BSA (Sigma, Buchs, Suiza), diluido a una concentración de 3,3 µg/ml en tampón de revestimiento de carbonato para ELISA (pH 9,6) durante la noche a 4° C. Los sitios de unión no específica se bloquearon durante 1 hora con PBS que contenía 2% de BSA Sigma, Buchs, Suiza]. Los anticuerpos específicos de TDP-43 humana se diluyeron a las concentraciones indicadas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión se determinó usando un anticuerpo secundario específico de IgG γ anti-humano de burro conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.) seguido de la medición de la actividad de la HRP en un ensayo colorimétrico estándar. Los valores de la CE₅₀ se estimaron mediante una regresión no lineal usando el software

GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.).

Como se divulga en la Tabla 4, los anticuerpos NI-205.51 C 1 y NI-205.21 G2 se unen a la TDP-43 humana con afinidad alta a CE_{50} subnanomolar de 180 pM y 240 pM, respectivamente. No se observó unión al péptido TDP-43-fosfo en C-terminal para estos anticuerpos. Los anticuerpos NI-205.3F10, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, y NI-205.87E7 se unieron a la TDP-43 humana pero no al péptido TDP-43-fosfo en C-terminal. Los valores de CE_{50} de estos anticuerpos para las proteínas TDP-43 humanas variaron de 1 a 18 nM. NI-205.21 G1 se unió a la TDP-43 de longitud completa a una CE_{50} de 4,1 nM y reconoció el péptido TDP-43-fosfo en C-terminal con una afinidad menor a una CE_{50} de 49,5 nM. Los anticuerpos NI-205.68G5 y NI-205.20A1 mostraron una unión preferencial o exclusiva al péptido TDP-43-fosfo en C-terminal con una CE_{50} de 16,9 y 15,8 nM, respectivamente, lo que sugiere que la fosforilación de la serina en la posición 409 y/o la serina en la posición 410 de TDP-43 es necesaria para la unión por NI-205.68G5 y NI-205.20A1.

Tabla 4: Afinidad del anticuerpo por TDP-43 y por TDP-43 fosforilada

Anticuerpo	TDP-43 de longitud completa CE50 (nM)	Péptido fosfo-TDP-43 CE50 (nM)
NI-205.51C1	0,18	N.A.
NI-205.21G2	0,24	N.A.
NI-205.3F10	1,4 - 2,8	N.A.
NI-205.8A2	7,2	N.A.
NI-205.15F12	7,2	N.A.
NI-205.113C4	13,2	N.A.
NI-205.25F3	13,3	N.A.
NI-205.87E7	17,2	N.A.
NI-205.21G1	4,1	49,5
NI-205.68G5	>100	16,9
NI-205.20A1	N.A.	15,8

Tabla 4: CE₅₀ de unión de los anticuerpos de unión a TDP-43 derivada de ser humano a TDP-43 recombinante y al péptido TDP-43-fosfo

15 **Ejemplo 3: Mapeo del epítipo con péptidos sintéticos (PepSpotting)**

Se usaron escáneres de péptidos solapantes para mapear los epítipos dentro de la proteína TDP-43 humana que es reconocida por los anticuerpos específicos de TDP-43 derivada de ser humano, Se usaron membranas Pepscan (PepSpots, JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) con 101 péptidos lineales de 15 unidades de 11 secuencias de aminoácidos solapantes que representa en conjunto toda la secuencia de la TDP-43 humana (Q 13148, TARDBP_HUMAN). Los péptidos se

pasaron a membranas de nitrocelulosa que se activaron después durante 5 minutos en metanol y después se lavaron a temperatura ambiente en TBS durante 10 minutos. Los sitios de unión no específica se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con Roti®-Block (Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Alemania). Los anticuerpos específicos de TDP-43 derivados de ser humano (1 µg/ml) se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente en Roti®-Block. La unión del anticuerpo primario se determinó usando anticuerpo secundario específico de IgG anti-humano de burro conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.). Las transferencias se desarrollaron usando detección ECL y ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza).

En la Tabla 4 se resumen los epítomos de unión identificados para los diferentes anticuerpos específicos de TDP-43 derivados de ser humano identificados usando PepSpot.

Tabla 5: Epítomos de unión identificados dentro de la secuencia de proteína TDP-43

5

Anticuerpo	Epitopo de unión
NI-205.3F10	213-QYGDVMDVFIP-223 (SEC ID N° 123)
NI-205.8A2	381-AAIGWGSASNA-391 (SEC ID N° 124)
NI-205.51C1	201-DMTEDELREFF-211 (SEC ID N° 125)
NI-205.87E7	9-EDENDEP-15 (SEC ID N° 126)
NI-205.113C4	133-VQVKKDL-139 (SEC ID N° 127)
NI-205.21G2	121-KEYFSTF-127 (SEC ID N° 128)

10 **Ejemplo 4 Unión de anticuerpos frente a TDP-43 recombinante humana a formas patológicas de TDP-43 en médula espinal y tejido cerebral humano**

Para la validación de la capacidad de unión del anticuerpo frente a TDP-43 se usaron secciones de médula
 15 espinal y de cerebro de pacientes humanos de ALS o pacientes con FTLD. La unión del anticuerpo a una TDP-43 patológica se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica. La unión de los anticuerpos anti-TDP-43 recombinantes humanos se caracterizó en tejido de casos de FTLD-TDP-43 (10 casos de pacientes, 7
 20 casos de controles). La inmunohistoquímica se realizó en secciones incluidas en parafina de 5 um de espesor y se incluyó el uso de recuperación de epítomos basada en EDTA antes de realizar los procedimientos con inmunoperoxidasa por otro lado estándar con kits de Elite ABC (Vector

Laboratories) con DAB (Pierce). Se usaron los anticuerpos primarios siguientes: Anticuerpo monoclonal de ratón 2E2-D3 producido contra TDP-43 humana (Abnova) como control positivo; anticuerpos anti-TDP-43 humanos recombinantes descritos en este documento/anteriormente NI205.3F10, NI205.51 C1, NI205.21G2, NI205.8A2, NI205.1 5F12, NI205.25F3, NI205.87E7, NI205.21G1, NI205.68G5, NI205.20A1. La secciones se contratiñeron con hematoxilina para revelar los núcleos celulares.

Los anticuerpos NI205.8A2, NI205.3F10, NI205.21 G2, y NI205.21G1 se unieron preferentemente a la TDP-43 citoplásmica (es decir, las formas patológicas de TDP-43) sobre la TDP-43 nuclear. Por el contrario, se observó que el anticuerpo control positivo disponible comercialmente 2E2 (Abnova, Taiwán) se unía a la TDP-43 tanto citoplásmica como nuclear. Es interesante el hecho de que la unión del anticuerpo NI205.21G1 demostró unión muy específica que parece ser comparable a la unión observada para los anticuerpos control que reconocen la TDP-43 fosforilada (Figura 11E y H).

Ejemplo 5: Validación in vivo de anticuerpo para TDP-43

Los experimentos para la validación preclínica de los anticuerpos para TDP-43 se realizan en modelos de ratón de proteinopatía de TDP-43. Anticuerpos para TDP-43 humana se

administran por inyección periférica o infusión intraventricular-cerebro mediante minibombas osmóticas. Los efectos del tratamiento se monitorizan por análisis de sangre y muestras de CSF, y análisis de peso corporal, impresión
5 clínica general y signos de deterioro motor o cognitivo como se observa mediante, por ejemplo, pruebas conductuales que incluyen campo abierto, laberinto en Y, laberinto en cruz elevada, reconocimiento de objetos novedosos, fuerza de agarre, resistencia de la fuerza de agarre de las patas,
10 prueba de la barra, andar desafiante en viga, rodillo giratorio, o de otro modo conocidas en la técnica.

Tras completarse los estudios de tratamiento, se miden los cambios en los niveles de TDP-43 en sangre recogida y CSF y se evalúan tejidos del cerebro y la médula espinal por
15 técnicas inmunohistoquímicas y bioquímicas cuantitativas para contenido en cerebro y médula espinal de TDP-43 fisiológica y patológica y neuropatología general.

Los modelos preclínicos útiles para validar los anticuerpos y otras moléculas de unión a TDP-43 de la
20 invención incluyen el sistema de modelo de ratón TDP-43-A315T como se describe por Wegorzewska y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (2009), 18809-14. El ratón A315T es un modelo transgénico de proteinopatía de TDP-43, en el que el fenotipo de los ratones muestra características de tanto ALS como

degeneración lobar frontotemporal con agregados de ubiquitina (FTLD-U).

Otros modelos adecuados incluyen el sistema de modelo de ratón B6.Cg-Tg (SOD1*G93A)1Gur/J como se describe por Gurney y col., Science 264 (1994), 1772-75. Esta línea de ratón expresa la forma mutante de G93A de la superóxido dismutasa 1 humana y desarrolla signos de enfermedad de las neuronas motoras seguido de progresión a muerte en el plazo de 6 a 8 meses. Estos ratones muestran una redistribución característica de TDP-43 al citoplasma de neuronas motoras y la aparición de inclusiones inmunorreactivas de TDP-43 y son, por tanto, un modelo adecuado para estudiar intervenciones farmacológicas que eligen TDP-43 como diana; véase, por ejemplo, Shan y col., Neuropharmacol, Letters 458 (2009), 70-74.

Otros experimentos para validar los anticuerpos para TDP-43 se realizan en el sistema de modelo de ratón TDP43WT como se describe por Wils y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106 (2010), 3858-63. Esta línea de ratón expresa TDP-43 humana natural y desarrolla degeneración de neuronas motoras corticales y espinales y desarrollo de cuadriplejia espástica alusiva a ALS. Una degeneración dependiente de la dosis de neuronas corticales y subcorticales no motoras característica de FTLD también se observa en esta línea de ratón. Las

neuronas en las regiones de la médula espinal y cerebro afectadas muestran acumulación de agregados nucleares y citoplásmicos de TDP-43 que están tanto ubiquitinados como fosforilados como se observa en pacientes con ALS/FTLD.

5 Otros experimentos para validar los anticuerpos para TDP-43 se realizan en un modelo independiente de enfermedad de las neuronas motoras, el modelo de ratón Wobbler (B6.B-Vps54wr/J, disponible de Jackson Laboratories) como se describe por Duchen y Strich, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 31 (1968), 535-42. Se informó que este modelo de
10 ratón mostraba amplias inclusiones de ubiquitina intracelulares y distribución citoplásmica anormal de TDP-43 alusivas a ALS esporádica, véase, por ejemplo, Dennis y Citron, Neuroscience 185 (2009), 745-50.

15 Otros experimentos para validar los anticuerpos para TDP-43 se realizan en ratones transgénicos TDP-43_G348C recientemente caracterizados que expresan en exceso TDP-43_G348C genómico humano bajo el control del promotor endógeno. Swarup y col., Brain 134 (2011), 2610-2626.

20 Otros experimentos para validar los anticuerpos para TDP-43 se realizan en sistemas de modelo, que incluyen líneas celulares transgénicas y animales transgénicos, que expresan o expresan en exceso TDP-43, mutantes de TDP-43, tales como truncaciones del extremo C de TDP-43, mutaciones de TDP-43

observadas en una población de pacientes, o mutantes que efectúan localización celular, por ejemplo, localización nuclear de TDP-43. Los sistema de modelo de TDP-43, por ejemplo, líneas celulares y modelos animales, para validar los anticuerpos para TDP-43 incluyen además sistemas con regulación por incremento demostrada de TDP-43 o acumulación resultante de los cambios en la expresión de un gen diferente, por ejemplo, el ratón Wobbler y modelos con regulación por disminución de progranulina. En una realización, los experimentos para validar los anticuerpos para TDP-43 se realizan en ratones que expresan TDP-43 humana con una señal de localización nuclear defectuosa en el prosencéfalo (Igaz y col., *J Clin Invest*, 121 (2): 726-38 (2011)); ratones transgénicos que expresan selectivamente el fragmento del extremo C de 25 kDa de TDP-43 en neuronas (Caccamo y col., *Am J Pathol*. 180(1):293-302 (2012)), ratones transgénicos que expresan condicionalmente TDP-43 humana natural (hTDP-43) en el prosencéfalo (Cannon y col., *Acta Neuropathol*. 123(6):807-23 (2012)), y ratones transgénicos con expresión ubicua de versiones naturales y causantes de enfermedad de VCP/p97 humano (Custer y col., *Hum Mol Genet*. 19(9): 1741-55 (2010)). En otra realización, los experimentos para validar los anticuerpos para TDP-43 se realizan en ratones transfectados con un vector AAV que codifica TDP-43

natural, TDP-43 de señal de localización nuclear defectuosa, o un fragmento del extremo C truncado de TDP-43 que comprende los residuos 220 a 414 de SEC ID N° 94. Tatom y col., Mol. Ther. 17 (2009), 607-613.

5 **Estudio de eficacia crónica:** Para evaluar los efectos farmacológicos de los anticuerpos anti-TDP-43 humana divulgados en este documento, ratones transgénicos TDP-43_G348C (Swarup y col., Brain 134 (2011), 2610-2626) se tratan semanalmente con 10 mg/kg de inyección i.p. de un
10 anticuerpo anti-TDP-43 humana o control de vehículo durante un periodo de 16 a 24 semanas. Después de 12 semanas de tratamiento, se recogen muestras de sangre por sangrado de la vena de la cola. Los niveles de anticuerpos anti-TDP-43 en suero se determinan por ELISA. Después de 12 semanas y 22
15 semanas de tratamiento, el comportamiento neurológico y cognitivo/motor se evalúa usando la prueba de campo abierto, prueba del laberinto en Y, prueba del laberinto en cruz elevada, prueba de reconocimiento de objetos novedosos, prueba de fuerza de agarre, prueba de resistencia de la
20 fuerza de agarre de las patas (PAGE), prueba de la barra, prueba de andar desafiante en viga, o prueba del rodillo giratorio. Se comparan los resultados de las pruebas del comportamiento neurológico y cognitivo/motor para animales tratados con anticuerpo y de control. El comportamiento

mejorado de los animales tratados con anticuerpo indica eficacia terapéutica del anticuerpo anti-TDP-43.

Estudio de eficacia aguda: Ratones transgénicos TDP-43_G348C (Swarup y col., Brain 134 (2011), 2610-2626) se
5 tratan con 1 a 4 inyecciones i.p. de hasta 50 mg/kg de anticuerpo anti-TDP-43 o control de vehículo en el plazo de un periodo de una semana. Al final del periodo de tratamiento, las muestras de sangre se recogen por sagrado de la vena de la cola. Los niveles de anticuerpo anti-TDP-43 en
10 suero se determinan por ELISA. Al final del periodo de tratamiento de 1 semana se evalúa el comportamiento neurológico y cognitivo/motor usando la prueba de campo abierto, prueba del laberinto en Y, prueba del laberinto en cruz elevada, prueba de reconocimiento de objetos novedosos,
15 prueba de fuerza de agarre, prueba de resistencia de la fuerza de agarre de las patas (PAGE), prueba de la barra, prueba de andar desafiante en viga, o prueba del rodillo giratorio. Se comparan los resultados de las pruebas del comportamiento neurológico y cognitivo/motor para animales
20 tratados con anticuerpo y de control. El comportamiento mejorado de los animales tratados con anticuerpo indica eficacia terapéutica del anticuerpo anti-TDP-43.

Ejemplo 6: Determinación de la afinidad de unión (CE₅₀) para anticuerpos para TDP-43 humana por ELISA directo.

La concentración semimáxima eficaz (CE_{50}) de los anticuerpos específicos para TDP-43 derivada de ser humano para TDP-43 humana y su especificidad por diana objetivo se determinó sustancialmente como se describe en el Ejemplo 2
5 anteriormente. Brevemente, microplacas de 96 pocillos (Corning) se recubrieron con TDP-43 de longitud completa recombinante (Biogen Idec, EE.UU.), extracto de *Escherichia coli* y BSA (Sigma, Buchs, Suiza), diluido a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de recubrimiento de ELISA de carbonato
10 (pH 9,6) durante la noche a 4 °C. Alternativamente, microplacas de la mitad de área de 96 pocillos (Corning) se recubrieron con un péptido sintético que cubría los residuos 390 a 414 del dominio del extremo C de TDP-43 con modificación de la fosforilación en los residuos 409/410
15 (Schafer-N, DK) y BSA (Sigma. Buchs, Suiza), diluido a una concentración de 3,3 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de recubrimiento de ELISA de carbonato (pH 9,6) durante la noche a 4 °C. Los sitios de unión no específica se bloquearon durante 1 h, a temperatura ambiente, con PBS que contenía 2 % de BSA (Sigma,
20 Buchs, Suiza). Los anticuerpos específicos para TDP-43 humana se diluyeron a las concentraciones indicadas y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. La unión se determinó usando un anticuerpo secundario de burro específico dirigido contra IgG γ humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch,

EE.UU.), seguido de medición de la actividad de HRP en un ensayo colorimétrico convencional. Los valores de CE_{50} se estimaron por una regresión no lineal usando el software GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.). Las curvas de valoración a modo de ejemplo obtenidas con los anticuerpos 41D1, 21G1 31D2 y 8F8 se muestran en las Figuras 4.

Como se ha divulgado en la Tabla 6, los anticuerpos NI-205.41D1 (Fig. 4A y E), NI-205.51C1 y NI-205.21G2 se unieron a TDP-43 humana con alta afinidad a CE_{50} subnanomolar de 60 pM, 180 pM y 240 pM, respectivamente. No se observó unión al péptido del extremo C de fosfo-TDP-43. Los anticuerpos NI-205.1A9, NI-205.3F10, NI-205.14W3, NI-205.98H6, NI-205.44B2, NI-205.9E12A, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.10D3, NI-205.38H2, NI-205.29E11, NI-205.9E12D, NI-205.31C11, NI-205.113C4, NI-205.25.25F3, NI-205.10H7, NI-205.8C10 y NI-205.87E7 se unieron a TDP-43 humana, pero no al péptido del extremo C de fosfo-TDP-43 con CE_{50} nanomolar. Para estos anticuerpos, los valores de CE_{50} oscilaron de 1 a 18 nM (véase la Tabla 6). El anticuerpo NI-205.21G1 (Fig. 4B y F) se unió a TDP-43 de longitud completa a CE_{50} 4,1 nM y reconoció péptido del extremo C de fosfo-TDP-43 con menor afinidad a CE_{50} 49,5 nM. Los anticuerpos NI-205.31D2 (Fig. 4C y G), NI-205.14H5, NI-205.36D5, NI-205.19G5 y NI-205.68G5 mostraron unión preferencial al péptido del extremo C de fosfo-TDP-43

con valores de CE_{50} que oscilaron de 0,7 a 17 nM (véase la Tabla 6). A diferencia, los anticuerpos NI-205.8F8, NI-205.8F8 (Fig. 4D y H) y NI-205.20A1 se unieron exclusivamente al péptido del extremo C de fosfo-TDP-43 humana con alta
 5 afinidad a CE_{50} nanomolar de 5 nM, 7 nM y 16 nM, respectivamente (véase la Tabla 6) de acuerdo con la idea de que la fosforilación de serina 409 y/o serina 410 se requirió para la unión.

Tabla 6: Unión de CE_{50} de anticuerpos para TDP-43 derivados de
 10 ser humano a TDP-43 humana recombinante y péptido del extremo C de fosfo-TDP-43.

15

Anticuerpo	CE_{50} [nM]	
	TDP-43 de longitud completa	péptido de fosfo-TDP-43
NI-205.41D1	0,06	sin unión
NI-205.51C1	0,18	sin unión
NI-205.21G2	0,24	sin unión
NI-205.1A9	1,0	sin unión

20

	Anticuerpo	CE ₅₀ [nM]	
		TDP-43 de longitud completa	péptido de fosfo-TDP-43
5	NI-205.3F10	1,4	sin unión
	NI-205.14W3	1,5	sin unión
	NI-205.98H6	2,6	sin unión
	NI-205.44B2	2,8	sin unión
	NI-205.9E12A	3,7	sin unión
10	NI-205.8A2	7,2	sin unión
	NI-205.15F12	7,2	sin unión
	NI-205.10D3	7,3	sin unión
	NI-205.38H2	8,2	sin unión
	NI-205.29E11	10,4	sin unión
15	NI-205.9E12D	11,2	sin unión
	NI-205.31C11	11,0	sin unión
	NI-205.113C4	13,2	sin unión
	NI-205.25F3	13,3	sin unión
	NI-205.10H7	15,3	sin unión
20	NI-205.8C10	15,6	sin unión
	NI-205.87E7	17,2	sin unión
	NI-205.21G1	4,1	49,5
	NI-205.31D2	> 41,0	0,69
	NI-205.14H5	> 100	0,90

Anticuerpo	CE ₅₀ [nM]	
	TDP-43 de longitud completa	péptido de fosfo-TDP-43
NI-205.36D5	> 72,0	4,3
NI-205.19G5	> 200	13,6
NI-205.68G5	> 100	16,9
NI-205.8F8	sin unión	5,1
NI-205.58E11	sin unión	6,9
NI-205.20A1	sin unión	15,8

Ejemplo 7: Análisis de unión de anticuerpo para TDP-43 humana por ELISA y transferencia Western

ELISA directos

Se realizaron ensayos de ELISA directos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1. Brevemente, los fragmentos de TDP-43 (SEC ID N° 94) que comprenden los aminoácidos 2 a 106 (dominio I), 99 a 204 (dominio II), 183 a 273 (dominio III), 258 a 414 (dominio IV) y TDP-43 de longitud completa (2 a 414) se recubrieron sobre placas de ELISA a concentración de recubrimiento igual de 6,6 µg/ml. La unión de los anticuerpos derivados de ser humano se determinó por ELISA directo. Ejemplos de los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5. Los anticuerpos NI-205.41D1 (Fig. 5A), NI-

205.14W3 (Fig. 5C), NI-205.44B2 (Fig. 5E), NI-205.10D3 (Fig. 5G) y NI-205.10H7 (Fig. 5L) se unieron específicamente al dominio IV de TDP-43 (aa 258 a 414). Los anticuerpos NI- NI-205.98H6 (Fig. 5D) se unieron específicamente al dominio III de TDP-43 (aa 183 a 273). Los anticuerpos NI-205.1A9 (Fig. 5B), NI-205.38H2 (Fig. 5H) y NI-205.31C11 (Fig. 5K) reconocieron específicamente el dominio II de TDP-43 (aa 99 a 204), mientras que los anticuerpos NI-205.9E12A (Fig. 5F), NI-205.29E11 (Fig. 5I), NI-205.9E12D (Fig. 5J) y NI-205.8C10 (Fig. 5M) se unieron al dominio I de TDP-43 (aa 2 a 106). Todos los anticuerpos específicos para TDP-43 derivados de ser humano también reconocieron TDP-43 humana de longitud completa. Para controlar la eficiencia del recubrimiento de los diferentes dominios de TDP-43 recombinante se usaron anticuerpos comercialmente disponibles que se unen a TDP-43 de longitud completa y un dominio de TDP-43 específico (Fig. 5W): i) Ab50930 (Abcam, RU), dominio I de TDP-43; ii) anticuerpo monoclonal para TARDBP (M01), clon 2E2-D3 (Abnova 23435, Abnova, Taiwan), dominio III de TDP-43 y iii) Ab82695 (Abcam, RU), dominio IV de TDP-43. Los anticuerpos de control se unieron a TDP-43 de longitud completa y su dominio de TDP-43 específico.

Unión a distintos dominios de TDP-43 por transferencia Western

TDP-43 de longitud completa recombinante, dominio I de TDP-43 (residuos de aminoácidos 2 a 106 de SEC ID N° 94), dominio II de TDP-43 dominio (residuos de aminoácidos 99 a 204 de SEC ID N° 94), dominio III de TDP-43 (residuos de aminoácidos 183 a 273 de SEC ID N° 94) y dominio IV de TDP-43 (residuos de aminoácidos 258 a 414 de SEC ID N° 94) se resolvieron por SDS-PAGE. La unión a dominios de TDP-43 específicos de los anticuerpos derivados de ser humano se determinó por análisis de transferencia Western.

Ejemplos de los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. Los anticuerpos NI-205.41D1 (Fig. 6A), NI-205.14W3 (Fig. 6F), NI-205.8A2 (Fig. 6H), NI-205.15F12 (Fig. 6I), NI-205.10D3 (Fig. 6J), NI-205.10H7 (Fig. 6L) y NI-205.21G1 (Fig. 6M) se unieron específicamente al dominio IV de TDP-43 (aa 258 a 414). Los anticuerpos NI-205.51C1 (Fig. 6B), NI-205.3F10 (Fig. 6E) y NI-205.98H6 se unieron específicamente al dominio III de TDP-43 (aa 183 a 273) mientras que los anticuerpos NI-205.21G2 (Fig. 6C), NI-205.1A9 (Fig. 6D) y NI-205.31C11 (Fig. 6K) reconocieron específicamente el dominio II de TDP-43 (99 a 204 aa). Estos trece anticuerpos específicos para TDP-43 derivados de ser humano también reconocieron TDP-43 de longitud completa humana. Sólo el anticuerpo NI-205.10D3 (Fig. 6J) reconoció un señal no específica adicional, lo más probablemente un contaminante de

proteína derivado de *E. coli*. NI-205.68G5 (Fig. 6N) y NI-205.20A1 (Fig. 6O), dos anticuerpos que muestran unión preferencial o exclusiva al péptido del extremo C de fosfo-TDP-43, no reconocieron TDP-43 de longitud completa recombinate o cualquiera de sus fragmentos. El anticuerpo específico para TDP-43 comercialmente disponible 2E2-D3 (Abnova 23435, Abnova, Taiwan) (Fig. 6P) se usó como control positivo para la detección de TDP-43 humana mientras que el anticuerpo específico para Fc γ dirigido contra IgG humana (Fig. 6Q) se usó como control negativo.

Los anticuerpos derivados de ser humano NI-205.44B2, NI-205.9E12A, NI-205.38H2, NI-205.29E11, NI-205.9E12D, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.8C10 y NI-205.87E7 reconocieron TDP-43 de longitud completa, pero no identificaron un fragmento de TDP-43 específica (datos no mostrados).

Ejemplo 8: Mapeo de epítopes con péptidos sintéticos (PepSpotting)

Los epítopes reconocidos por los anticuerpos específicos para TDP-43 derivados de ser humano dentro de la proteína TDP-43 humana se mapearon usando membranas pepscan (PepSpots, JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania) con 101 péptidos 15-mericos lineales con solapamiento de 11 aa entre péptidos individuales que cubrían la secuencia de proteínas TDP-43

humana entera. El mapeo con pepscan se realizó sustancialmente como se describe en el Ejemplo 3. Brevemente, los péptidos se aplicaron en puntos sobre membranas de nitrocelulosa que luego se activaron durante 5 min en metanol y posteriormente se lavaron a temperatura ambiente en TBS durante 10 min. La Tabla 7 resume los epítopes de unión para los diferentes derivados de anticuerpos específicos para TDP-43 de ser humano identificados usando PepSpot.

Tabla 7: Epítopes de unión dentro de la secuencia de proteínas TDP-43 humana para los diferentes anticuerpos específicos para TDP-43 derivados de ser humano identificados usando PepSpot. NA - no aplicable.

	Anticuerpo	Epítope de unión	Efecto de la fosforilación en residuos de Ser409 y/o Ser410
15	NI-205.41D1	317-SINPAMMAAAQAAL QSSWGMMGMLASQ-343 (SEC ID N° SEC ID N°323)	NA
20	NI-205.51C1	201-DMTEDELREFF-211 (SEC ID N° SEC ID N°125)	NA
	NI-205.21G2	121-KEYFSTF-127 (SEC ID N° SEC ID N°128)	NA
	NI-205.3F10	213-QYGDVMDVFIP-223 (SEC ID N° SEC ID N°123)	NA

	Anticuerpo	Epítotope de unión	Efecto de la fosforilación en residuos de Ser409 y/o Ser410
5	NI-205.98H6	249-IIKGISV-255 (SEC ID N° SEC ID N°315)	NA
	NI-205.44B2	345-NQSGPSG-351 (SEC ID N° SEC ID N°316)	NA
	NI-205.8A2	381-AAIGWGSASNA-391 (SEC ID N° SEC ID N°124)	NA
10	NI-205.15F12	397-FNGGFGS-403 (SEC ID N° SEC ID N°317)	NA
	NI-205.10D3	289-FGNSRGGGAGL-299 (SEC ID N° SEC ID N°318)	NA
15		389-SNAGSGSGFNG-399 (SEC ID N° SEC ID N°319)	
	NI-205.113C4	133-VQVKKDL-139 (SEC ID N° SEC ID N°127)	NA
	NI-205.10H7	269-QLERSGRFNGN-279 (SEC ID N° SEC ID N°320)	NA
20	NI-205.8C10	17-EIPSEDD-23 (SEC ID N° SEC ID N°321)	NA

	Anticuerpo	Epítotope de unión	Efecto de la fosforilación en residuos de Ser409 y/o Ser410
5	NI-205.87E7	9-EDENDEP-15 (SEC ID N° SEC ID N°126)	NA
	NI-205.21G1	390 a 414	Fosforilación de Ser409/Ser410 unión parcialmente inhibida
	NI-205.31D2	390 a 414	Unido a péptido fosforilado en Ser409 y Ser410
10	NI-205.14H5	390 a 414	Unido a péptido fosforilado en Ser409 y/o Ser410; unión débil también observada independiente de la fosforilación
15	NI-205.36D5	390 a 414	Unido a péptido fosforilado en Ser409; la fosforilación simultánea de Ser410 anula la unión

5	Anticuerpo	Epítotope de unión	Efecto de la fosforilación en residuos de Ser409 y/o Ser410
10	NI-205.19G5	390 a 414	Unido a péptido fosforilado en Ser409; la fosforilación simultánea de Ser410 anula la unión
15	NI-205.68G5	390 a 414	Unido a péptido fosforilado en Ser409 y/o Ser410
	NI-205.8F8	390 a 414	no determinado
	NI-205.58E11	390 a 414	no determinado
	NI-205.20A1	390 a 414	Unido a péptido fosforilado en Ser409 y Ser410

Determinación del epítotope de unión de NI-205.41D1 por ensayos de ELISA.

20 TDP-43 de longitud completa (2 a 414) y fragmentos del extremo C de TDP-43 que comprenden los aminoácidos 258 a 414 (dominio IV), 258 a 384, 258 a 375, 258 a 362, 258 a 353, 258 a 319, 317 a 414 y 340 a 414 se recubrieron sobre placas de ELISA a concentración de recubrimiento igual de 10 µg/ml. La

unión del anticuerpo NI-205.41D1 a fragmentos de TDP-43 específica se determinó por ELISA directo. Ejemplos de los datos obtenidos se proporcionan en la Figura 7A, NI-205.41D1 se unió a todos los fragmentos recombinantes, excepto a los
5 fragmentos 258 a 319 y 340 a 414, que indica que el epítipo de unión de NI-205.41D1 estaba en la región 317 a 353 del extremo C de TDP-43. El anticuerpo NI-205.41D1 se unió a TDP-43 de longitud completa.

TDP-43 de longitud completa (2 a 414), dominio IV de TDP-43 natural que comprende los residuos 258 a 414 de SEC ID N°
10 94 (258 a 414 de TDP-43) y un dominio IV de TDP-43 mutante (258 a 414 de TDP-43 AMM321GGG) que llevan la sustitución A a G en el residuo 321, la sustitución M a G en el residuo 322 y la sustitución M a G en el residuo 323 se recubrieron sobre
15 placas de ELISA a concentración de recubrimiento igual de 10 µg/ml. La unión del anticuerpo NI-205.41D1 a variantes del dominio IV de TDP-43 específica se determinó por ELISA directo (Figura 7B). NI-205.41D1 se unió específicamente a TDP-43 de longitud completa y al dominio IV de TDP-43
20 natural, pero no al dominio IV de TDP-43 mutante, que indica que uno o más de los residuos mutados fue esencial para la unión de NI-205.41D1 a TDP-43 humana. Para controlar la eficiencia de recubrimiento de las diferentes especies de TDP-43 recombinante se usó el anticuerpo 12892-1-AP

comercialmente disponible que se une a TDP-43 de longitud completa.

Péptidos biotinilados sintéticos que comprenden los residuos 316 a 353 (316 a 353 de TDP-43), 316 a 343 (316 a 343 de TDP-43) y 316 a 333 (316 a 333 de TDP-43) de SEC ID N° 94 se recubrieron sobre placas recubiertas con estreptavidina a concentración de recubrimiento igual de 10 µg/ml. La unión del anticuerpo NI-205.41D1 a péptidos del extremo C de TDP-43 específica se determinó por ELISA directo (Figura 7C). NI-205.41D1 se unió específicamente a los péptidos 316 a 353 de TDP-43 y 316 a 343 de TDP-43, pero no al péptido 316 a 333 de TDP-43. Este resultado está de acuerdo con la idea de que los residuos 334 a 343 de SEC ID N° 94 en la región del extremo C de TDP-43 participan en la unión del anticuerpo NI-205.41D1 a TDP-43 humana. Los resultados de estos inventores están de acuerdo con un entendimiento de que el epítope de unión del anticuerpo NI-205.41 es discontinuo entre los residuos 317 a 343 de SEC ID N° 94 y está formado por dos regiones de unión independientes: la primera que comprende los residuos 321 a 323 de SEC ID N° 94 y la segunda que comprende los residuos 334 a 343 de SEC ID N° 94.

Ejemplo 9: Los anticuerpos específicos para TDP-43 derivados de ser humano interaccionan con TDP-43 nativa

La proteína TDP-43 de longitud completa pura tiene una

tendencia natural a agregarse. Por tanto, sólo cantidades muy pequeñas de TDP-43 de longitud completa soluble se recuperaron bajo condiciones de purificación convencionales. Estos inventores desarrollaron así una estrategia de
5 expresión y purificación recombinante para aislar grandes cantidades de TDP-43 humana marcada de longitud completa marcada con 6xHis-SUMO funcional de *Escherichia coli* usando KSCN y arginina, agentes caotrópicos suaves conocidos por preservar la estructura de proteínas nativas a la vez que
10 previenen la agregación de proteínas.

Plásmidos: Polinucleótidos que codifican TDP-43 de longitud completa humana (1 a 414 de SEC ID N° 94) y sus residuos de truncación 101 a 265 y los residuos 220 a 414 de SEC ID N° 94 se amplificaron usando procedimientos
15 convencionales y se subclonaron en un vector pET19-b modificado (Novagen) produciendo marcas de 6xHis y SUMO en el extremo N de la proteína codificada por los polinucleótidos amplificados. Una representación esquemática de los polipéptidos recombinantes marcados con 6xHis/SUMO se muestra
20 en la Figura 8B.

Expresión y purificación de proteínas: Plásmidos de expresión de TDP-43 marcados con 6xHis/SUMO se transformaron en *Escherichia coli* BL21(DE3) Star (Invitrogen). Los cultivos bacterianos se cultivaron a una DO600 de 1,0 a 37 °C y se

indujeron con IPTG 1 mM durante 16 h a 18 °C. Después de la sedimentación, las células se lisaron por microfluidización en tampón de purificación con inhibidores de proteasa (HEPES 40 mM (pH 7,5), KSCN 1,5 M y tris(2-carboxietil)fosfina 1 mM (TCEP), PMSF 1 mM, pepstatina 5 μ M, benzamina 1 mM, bestatina 10 μ M, E-64 10 μ M, leupeptina 20 μ M, aprotinina 1,5 μ M). Para generar apropiadamente TDP-43 de longitud completa plegada, TDP-43 (101 a 265) y TDP-43 (220 a 414), las proteínas de fusión marcadas con 6xHis-SUMO correspondientes se purificaron sobre resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, usando tampón de purificación para la unión y el lavado. Las proteínas unidas se eluyeron de la resina de Ni-NTA con el mismo tampón que contenía imidazol 250 mM y se purificaron además sobre una columna de exclusión por tamaño S200 preparativa (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante usando tampón de purificación. Las fracciones que contenían proteínas TDP-43 monoméricas se reunieron, y se re-formularon en un tampón que contenía HEPES 40 mM (pH 7,5), arginina 400 mM, TCEP 1 mM por diálisis. 6xHis-SUMO-TDP43 (101-265) se purificó además usando la misma estrategia de purificación, pero alterando las composiciones del tampón sustituyendo KSCN 1,5 M con KCl 0,5 M. Para preparar 6xHis-TDP-43 sin plegar, las células se lisaron por microfluidización en un tampón

Tris-imidazol (Tris 50 mM (pH 7,5), imidazol 20 mM, NaCl 150 mM) con inhibidores de proteasa. El sedimento insoluble se lavó secuencialmente con los siguientes tampones que contenían inhibidores de proteasa: tampón B-PER (Pierce) que
5 contenía MgCl_2 2 mM, seguido de tampón Tris-imidazol. Los sedimentos lavados se solubilizaron a continuación en urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM (pH 7,8). Entonces, el material soluble en urea se purificó sobre resina de agarosa Ni-NTA siguiendo las instrucciones del fabricante, usando
10 condiciones de lavado y elución desnaturalizantes. La determinación de los coeficientes sedimentación y difusión (Figura 8C), además de la separación de SDS-PAGE (Figura 8A), se llevaron a cabo mediante procedimientos convencionales (Laue, T. y col. (1992) en Analytical Ultracentrifugation in
15 Biochemistry and Polymer Science (Harding, S. E., ed) Royal Society of Chemistry, Cambridge, RU).

ELISA de captura: Placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) se recubrieron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-6xHis (Clontech) diluido a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$
20 en tampón PBS (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8,05 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) a 4 °C durante la noche. Los sitios de unión no específicos se bloquearon durante 1 h a TA con PBS que contenía 1 % de BSA (Sigma) y 0,05 % de Tween-20 (Fisher Scientific). Las proteínas 6xHis-SUMO-TDP43 a una

concentración de 1,7 μM se dejaron unirse a placas recubiertas de anticuerpo durante 1 h a TA en tampón PBS que contenía 1 % de BSA, arginina 300 mM y 0,1 % de PEG 5000, pH 7,5. Las placas se incubaron durante 1 h a TA con anticuerpos humanos de esta invención, se valoraron en una serie triple de dilución, seguido de Fc γ dirigido contra IgG humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) en PBST que contenía 1 % de BSA. La actividad de HRP se midió en un ensayo colorimétrico convencional. Los valores de CE_{50} se calcularon usando un ajuste de la curva logística de cuatro parámetros en el software Softmax pro (Molecular Devices).

Ensayo de unión a ARN: Las afinidades de unión en equilibrio de construcciones de TDP-43 por ARN se determinaron usando polarización por fluorescencia. Sustratos de ARN marcados con el fluoróforo 5'TYETM, ARN específico (TYETM-UGUGUGUGUGUG) (SEC ID N° 312) y control de ARN (TYETM-UUUUUUUUUUUU) (SEC ID N° 313) (Integrated DNA Technologies), se incubaron a una concentración de 5 nM durante 30 min a 25 °C con TDP-43 (concentraciones finales 0 a 20 μM) en tampón de incubación como se indica. La polarización por fluorescencia se midió con el lector de placas-fluorímetro Envision (PerkinElmer) a cada concentración de TDP-43 en un formato de placa de 96 pocillos con una excitación a 645 nm y emisión a 665. Las K_d se calcularon usando la ecuación

cuadrática para la estrecha unión (ecuación de Morrison) usando Sigmaplot (Systat Software Inc.). Para determinar la estequiometría de la unión de ARN/TDP-43, se usó el mismo equipo experimental de polarización por fluorescencia con la
5 adición de 95 nM de ARN sin marcar de la misma secuencia para una concentración de ARN total de 100 nM (>7x superior a los valores de K_d previamente determinados). Las estequiometrias se calcularon midiendo la ordenada en el origen de dos líneas rectas, un ajuste usando puntos de datos del estado
10 parcialmente unido y el otro usando puntos de datos del estado completamente unido.

La TDP-43 de longitud completa recombinante fue monomérica mediante análisis de sedimentación (Figura 8C) en tampón que contenía arginina 400 mM. Se mantuvo un mínimo de
15 arginina 300 mM en ensayos analíticos cuando se deseó TDP-43 nativa monomérica, debido a que la agregación se observó a menores concentraciones de arginina. De acuerdo con que la arginina no afecta adversamente la actividad de TDP-43, la TDP-43 de longitud completa recombinante de estos inventores
20 se une a un ARN de secuencia específica previamente establecida (UGUGUGUGUGUG (SEC ID N° 312)) con afinidad al menos 30 veces superior que una secuencia no específica genérica (UUUUUUUUUUUU (SEC ID N° 313)) (Figura 9).

Estos inventores también purificaron un fragmento de TDP-

43 marcado con 6xHis/SUMO que comprendía los residuos de aminoácidos 101 a 265 de SEC ID N° 94 de los que se eliminó el dominio del extremo C (aminoácidos 265 a 414) que se sabía que mediaba en la agregación. El fragmento de TDP-43 truncado en 101 a 265 marcado con 6xHis/SUMO, purificado con o sin caótopos, mantuvo una afinidad de unión por la secuencia de ARN específica muy similar a la K_D previamente informada (~14 nM) a pesar de los procedimientos analíticos muy diferentes usados (Figura 9). Véase Kou Nucleic Acids Res. 2009, 37:1799-808. La estequiometría de la unión de ARN/TDP-43 también fue la misma independientemente de la estrategia de purificación, que indica que no hubo diferencia significativa en la población de proteínas desnaturalizadas entre las dos preparaciones (Figura 9). Juntos, estos datos indicaron que la TDP-43 de longitud completa pura recombinante purificada estaba en su estado de plegamiento nativo.

Estos inventores midieron la afinidad de unión de los anticuerpos específicos para TDP-43 derivados de ser humano proporcionados en este documento por TDP-43 marcada con 6xHis/SUMO apropiadamente plegada usando un ELISA de captura en el que TDP-43 nativa se inmovilizó sin adsorción directa sobre la superficie de la placa de ELISA. Esto se logró inmovilizando un anticuerpo anti-6xHis que luego capturó TDP-

43 nativa. La unión a la marca anti-6xHis por TDP-43 de longitud completa humana marcada con 6xHis/SUMO plegada se logró a concentración de arginina 300 mM, asegurando un estado monomérico de TDP-43. Después de esta etapa de inmovilización, la unión por anticuerpos humanos se probó en tampones regulares sin interferencia de agregación de TDP-43. Un ejemplo de las curvas de valoración generadas se muestra en la Figura 10. La Tabla 8 resume las afinidades (CE_{50} [nM]) por TDP-43 marcada con 6xHis/SUMO de longitud completa plegada, o por una construcción de truncación marcada con 6xHis/SUMO que contiene la región propensa a la agregación del extremo C de TDP-43 (residuos 220 a 414 de SEC ID N° 94) por este procedimiento de ELISA de captura.

Tabla 8: Unión de CE_{50} [nM] de anticuerpos para TDP-43 derivados de ser humano a TDP-43 de longitud completa marcada con 6xHis/SUMO recombinante apropiadamente plegada y TDP-43 truncada marcada con 6xHis/SUMO que comprende los residuos 220 a 414.

20

Anticuerpo	TDP-43 de longitud completa	Residuos de TDP-43 220 a 414
NI-205.41D1	0,07	0,10
NI-205.51C1	1,1	sin unión
NI-205.21G2	3,6	sin unión
NI-205.1A9	>98	sin unión
N1-205.3F10	>90	sin unión

	Anticuerpo	TDP-43 de longitud completa	Residuos de TDP-43 220 a 414
5	NI-205.14W3	7,4	1,6
	NI-205.98H6	46	20
	NI-205.44B2	>125	33,5
	NI-205.9E12A	sin unión	–
	NI-205.8A2	34	4,6
10	NI-205.15F12	16,3	9,7
	NI-205.10D3	>90	20,5
	NI-205.38H2	>120	sin unión
	NI-205.29E11	>100	>97
	NI-205.9E12D	sin unión	sin unión
15	NI-205.31C11	21,1	sin unión
	NI-205.113C4	sin unión	sin unión
	NI-205.25F3	>120	>100
	NI-205.10H7	30,9	6,45
	NI-205.8C10	sin unión	–
20	NI-205.87E7	sin unión	sin unión
	NI-205.21G1	4,4	0,33
	NI-205.31D2	41,0	19,4
	NI-205.14H5	> 100	–
	NI-205.36D5	> 72,0	>60
	NI-205.19G5	sin unión	–

5

Anticuerpo	TDP-43 de longitud completa	Residuos de TDP-43 220 a 414
NI-205.68G5	sin unión	–
NI-205.8F8	>94	–
NI-205.58E11	sin unión	–
NI-205.20A1	sin unión	–

Ejemplo 10: Evaluación de anticuerpo para TDP-43 derivado de ser humano que se une a TDP-43 en tejidos hipocámpicos de pacientes con FTLD-U y de control.

10 Tejidos de FTLD-U cortical, hipocámpica y de médula espinal y de control humanos se obtuvieron de IDIBAPS Biobank (Banc de Teixits Neurologics, Barcelona). La inmunohistoquímica se realizó en secciones incorporadas en parafina de 5 μ m de espesor usando recuperación de epítopes

15 basada en EDTA antes de realizar los procedimientos inmunohistoquímicos de otro modo convencionales con kits Elite ABC (Vector Laboratories) con DAB (Thermo Scientific). La inmunohistoquímica se realizó usando los anticuerpos para TDP-43 humana de la invención a concentración 50 nM. Las

20 tinciones de control se hicieron usando anticuerpo monoclonal de ratón 2E2 contra TDP-43 humana (Abnova), anticuerpo policlonal de conejo p409/p410 producido contra p409/p410 de TDP-43 (CosmoBio) y anticuerpo policlonal de conejo p409/p410 producido contra p409/p410 de TDP-43 (CosmoBio).

La capacidad de los anticuerpos anti-TDP-43 derivados de ser humano descritos en este documento para reconocer formas nativas y patológicas de TDP-43 se caracterizó por experimentos de inmunohistoquímica en tejidos hipocámpicos de

5 pacientes con FTLD-U humana (10) y de control (7). TDP-43 es una proteína predominantemente nuclear que se transporta a y del citoplasma. Bajo afecciones patológicas se acumula en el núcleo y particularmente en el citoplasma, y la patología se caracteriza/clasifica normalmente basándose en la

10 localización celular; NCI - inclusión citoplásmica neuronal, NII - inclusión intranuclear neuronal, y patología neurítica distrófica (revisado en Mackenzie y col., Lancet Neurology, 9: 995-1007 (2010)). En tejidos de pacientes con FTLD-U y ALS también se encuentra que la proteína está fosforilada. Las

15 características de unión de TDP-43 humana de los anticuerpos divulgados en este documento se compararon con las de anticuerpos comercialmente disponibles comúnmente usados para diagnosticar pacientes cadavéricos. El anticuerpo de control 2E2-D3 (epítipo mapeado con aa 205 a 222; Zhang y col.,

20 Neurosci. Lett., 434: 170-174 (2008)) reconoció la acumulación de TDP-43 nuclear y citoplásmica en neuronas piramidales hipocámpicas (Figura 11A) y células granulosas (Figura 11B), además de TDP-43 en axones distróficos (Figura 11C). En tejidos de pacientes de control, 2E2-D3 reconoció

predominantemente TDP-43 nuclear. El anticuerpo específico de fosforilación, p403/p404 (producido contra CNGGFGS(p)S(p)MDSK (SEC ID N° 324); Hasegawa y col., Ann Neurol, 64(1):60-70 (2008)) reconoció (Figura 11D) TDP-43 citoplásmica en células piramidales, (Figura 11E) acumulación nuclear y citoplásmica en células granulosas, además de (Figura 11F) TDP-43 en axones distróficos. Un segundo anticuerpo específico de fosforilación, p409/p410 (producido contra CMDSKS(p)S(p)GWGM (SEC ID N° 325); Hasegawa y col., Ann Neurol, 64(1):60-70 (2008)) se unió a TDP-43 que se acumula en el núcleo y citoplasma de (Figura 11G) células piramidales y (Figura 11H) células granulosas, además de (Figura 11I) TDP-43 en axones distróficos.

Los anticuerpos anti-TDP-43 derivados de ser humano descritos en este documento mostraron diversos patrones de tinción, que incluyen unión a formas nucleares, citoplásmicas y neuríticas de TDP-43. Varios de los anticuerpos anti-TDP-43 derivados de ser humano descritos en este documento se unieron específicamente a formas de enfermedad de TDP-43, en comparación con la tinción en tejidos de pacientes de control de individuos sanos (Figura 11 y Tabla 9). Por ejemplo, los anticuerpos NI-205.68G5, NI-205.14W3, NI-205.21G1 y NI-205.41D1 se unieron selectivamente a formas patológicas, es decir, a TDP-43 neurítica, y TDP-43 nuclear y citoplásmica en

células granulosas hipocámpicas. Los anticuerpos NI-205.14W3, NI-205.21G1 y NI-205.41D1 se unieron específicamente a formas patológicas de TDP-43 en tejidos de pacientes con FTLD-U sin unión a tejidos de pacientes de control (véase la tinción de
 5 NI-205.41D1 en tejidos de pacientes con FTLD-U (Figura 11Y) y tejido de pacientes de control (Figura 11Z)).

El anticuerpo (Fig. 11J) NI-205.10D3 se unió predominantemente a TDP-43 nuclear, mientras que (Fig. 11K) NI-205.8C10 se unió a TDP-43 en citoplasma y axones. A
 10 diferencia de los anticuerpos anti-TDP-43 de control analizados, un subconjunto de los anticuerpos anti-TDP-43 humanos informados en este documento se unió predominantemente a TDP-43 citoplásmica, en vez de a TDP-43 nuclear. Los anticuerpos que se unieron predominantemente a
 15 TDP-43 citoplásmica incluyen (Fig. 11L) NI-205.15F12, (Fig. 11M) NI-205.8A2, (Fig. 11N) NI-205.3F10, (Fig. 11O) NI-205.21G2, (Fig. 11P) NI-205.8F8, (Fig. 11Q) NI-205.31C11 (Fig. 11R) NI-205.36D5, (Fig. 11S) NI-205.31D2, (Fig. 11T) NI-205.10H7 y (Fig. 11U) NI-205.14H5. Los anticuerpos (Fig.
 20 11V) NI-205.68G5, (Fig. 11W) NI-205.14W3, (Fig. 11X) NI-205.21G1 y (Fig. 11Y) NI-205.41D1 se unieron a TDP-43 neurítica y TDP-43 que se acumula en el núcleo y citoplasma en células granulosas hipocámpicas.

Tabla 9: Evaluación de anticuerpo para TDP-43 derivado de ser

humano que se une a TDP-43 en tejidos hipocámpicos de pacientes con FTLD-U y de control. Las muestras de pacientes y de control también se tiñeron con anticuerpos anti-TDP-43 de control 2E2-D3, p403/p404, p409/p410. ND - no determinado

5	Anticuerpo	Tinción de anticuerpo por inmunohistoquímica	
		Tejido de pacientes con FTLD-U	Tejido de control
10	NI-205.41D1	citoplásmico y nuclear en células granulosas + neuríticas	sin unión
	NI-205.51C1	sin unión	ND
	NI-205.21G2	citoplásmico	ND
	NI-205.1A9	sin unión	ND
15	NI-205.3F10	citoplásmico	citoplásmico
	NI-205.14W3	citoplásmico y nuclear en células granulosas + neuríticas	sin unión, citoplásmico en neuronas (en algunos pacientes)
	NI-205.98H6	sin unión	ND
	NI-205.44B2	sin unión	ND
20	NI-205.9E12A	sin unión	ND
	NI-205.8A2	citoplásmico	citoplásmico

	Anticuerpo	Tinción de anticuerpo por inmunohistoquímica	
		Tejido de pacientes con FTLD-U	Tejido de control
5	NI-205.15F12	citoplásmico en células granulosas	ND
	NI-205.10D3	nuclear	nuclear
	NI-205.38H2	sin unión	ND
	NI-205.29E11	sin unión	ND
	NI-205.9E12D	sin unión	ND
10	NI-205.31C11	citoplásmico	citoplásmico
	NI-205.113C4	sin unión	ND
	NI-205.25F3	sin unión	ND
	NI-205.10H7	citoplásmico	citoplásmico
	NI-205.8C10	citoplásmico + axonal (un paciente)	sin unión
15	NI-205.87E7	sin unión	ND
	NI-205.21G1	citoplásmico y nuclear en células granulosas + neuríticas	sin unión
	NI-205.31D2	citoplásmico	citoplásmico

5	Anticuerpo	Tinción de anticuerpo por inmunohistoquímica	
		Tejido de pacientes con FTLD-U	Tejido de control
	NI-205.14H5	citoplásmico	Citoplásmico
	NI-205.36D5	citoplásmico	citoplásmico
	NI-205.19G5	sin unión	ND
10	NI-205.68G5	citoplásmico + neuríticas (un paciente)	ND
	NI-205.8F8	citoplásmico	citoplásmico
	NI-205.58E11	sin unión	ND
	NI-205.20A1	no	ND
15	2E2-D3	Nuclear, citoplásmico y neurítico	Nuclear (citoplásmico en algunos controles)
	p403/p404	Nuclear, citoplásmico y neurítico	sin unión
	p409/p410	Nuclear, citoplásmico y neurítico	Sin unión

20 La selección de anticuerpos anti-TDP-43 humana usando TDP-43 recombinante desnaturalizada y el péptido 390 a 414 de TDP-43 fosforilado en los residuos S409 y S410 produjo la generación de anticuerpos que cubren la mayoría de los epítopes naturales y relacionados con enfermedad de TDP-43

humana. Los anticuerpos anti-TDP-43 humana divulgados en este documento identifican epítopes nuevos e interesantes de TDP-43, y proporcionan novedosa información conformacional específica para el proceso de enfermedad de proteinopatías de TDP-43. Por ejemplo, NI-205.14W3, NI-205.21G1 y NI-205.41D1 se unieron a TDP-43 con alta afinidad y fueron específicos para formas patológicas de TDP-43 sobre tejidos de FTLD-U en comparación con pacientes de control. Aunque estos tres anticuerpos tuvieron patrón de tinción específica para TDP-43 patológica similar en inmunohistoquímica, reconocieron distintos epítopes en la región del extremo C propensa a la agregación de TDP-43: NI-41D1 se unió a un epítope discontinuo en la porción del extremo C de TDP-43 y NI-21G1 se unió a una región propensa a la fosforilación de TDP-43. Además, los anticuerpos NI-205.14H5 y NI-205.31D2 tuvieron alta afinidad por TDP-43 fosforilada en uno o ambos de los residuos S409 y S410, y específicamente tiñeron TDP-43 citoplásmica en inmunohistoquímica. Además, NI-205.21G2 y NI-205.51C1 también demostraron alta afinidad por TDP-43, y se unieron a epítopes del extremo N con respecto al sitio de escisión de caspasa predicho, uniéndose NI-205.51C1 al motivo 2 de reconocimiento de ARN (RRM2). NI-205.10D3 tiñó específicamente TDP-43 nuclear en tanto tejidos de pacientes con FTLD-U como de control, sugiriendo que se unió a formas

endógenas/nativas de TDP-43.

Ejemplo 11: Estudio de penetración cerebral aguda

Ratones transgénicos TDP-43_G348C (Swamp y col., Brain 134 (2011), 2610-2626) se inyectaron intraperitonealmente con
5 30 mg/kg de anticuerpo anti-TDP-43 humana o volumen igual de PBS en el día 1 y el día 4. En el día 5, los ratones se perfunden bajo anestesia con PBS que contenía 1 unidad/ml de heparina. La sangre, cerebro y médula espinal se recogen para análisis. El hemisferio derecho del cerebro se congela a -80
10 °C, el hemisferio izquierdo del cerebro y la médula espinal se fijan posteriormente en 10 % de formalina neutralizada a 4 °C durante dos días antes de incorporarse en bloque de parafina y seccionarse. El plasma se almacena a -80 °C en alícuotas.

15 Extracción de proteína del cerebro: Las fracciones de proteína del cerebro se extraen usando procedimientos experimentales convencionales, por ejemplo, el hemisferio derecho congelado se pesa y se homogeneiza en 5 volúmenes (5 ml/g de tejido húmedo) de una disolución que contiene NaCl 50
20 mM, 0,2 % de dietilamina, inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics GmbH) e inhibidor de fosfatasa (Roche Diagnostics GmbH). Entonces, las muestras se transfieren a tubos de policarbonato y se añaden otros 5 volúmenes de disolución de homogenización, y se mantienen sobre hielo durante 30 min.

Entonces, la fracción soluble se recoge después de la centrifugación a 100.000 g, 4 °C durante 30 min. Esta fracción soluble se usa en ensayo de IgG humana. El sedimento se resuspende en 3 volúmenes de PBS con inhibidor de proteasa y fosfatasa. Después de la centrifugación a 16.000 g, 4 °C durante 30 min, los sobrenadantes y sedimentos se almacenan por separado a -80 °C para la posterior extracción de TDP-43 insoluble.

El anticuerpo humano y TDP-43 se detectan y cuantifican en los extractos de proteína del cerebro usando procedimientos experimentales convencionales. Por ejemplo, ELISA tipo sándwich específico de IgG humana: como anticuerpo de captura se usan 2 µg/ml de Fab de cabra dirigido contra IgG humana (Jackson) en tampón de recubrimiento de ELISA de carbonato 50 mM (pH 9,6). Placas de microtitulación de 96 pocillos de la mitad de área se recubren con 30 µl/pocillo con anticuerpo de captura a 4 °C durante la noche. Entonces, la placa se lava 4 veces con PBS que contiene 0,1 % de Tween 20 antes de incubar con 50 µl/pocillo de PBS que contiene 2 % de BSA a temperatura ambiente durante una hora. Las fracciones solubles de extractos de cerebro, muestras de plasma y patrón de anticuerpo humano se diluyen en PBS que contiene 2 % de BSA y 0,1 % de Tween 20. 30 µl de las muestras diluidas se añaden a cada pocillo y se incuban a

temperatura ambiente durante una hora. Entonces, la placa se lava con 200 μ l/pocillo de PBS que contiene 0,1 % de Tween 20 durante cuatro veces antes de incubar con Fc γ de burro anti-humano conjugado con HRP (Jackson, diluido a 1:10.000 en PBS que contiene 2 % de BSA y 0,1 % de Tween 20) a temperatura ambiente durante una hora. Entonces, la placa se lava con 200 μ l/pocillo de PBS que contiene 0,1 % de Tween 20 durante cuatro veces antes de añadir 20 μ l/pocillo de TMB (1:20 en disolución de citrato 10 mM a pH=4,1). La reacción se detiene entonces añadiendo 10 μ l de H₂SO₄ 1 M a cada pocillo. La curva patrón del anticuerpo se obtiene a partir de diluciones sucesivas de anticuerpo de control. Las concentraciones de anticuerpo en muestras de plasma y cerebro se calculan según los patrones. El nivel de IgG humana en cerebro se convierte entonces en μ g de anticuerpo/gramo de tejido de cerebro fresco.

La penetración neuronal del anticuerpo anti-TDP-43 humana administrado se detecta por tinción inmunohistológica de secciones de tejido de cerebro obtenidas de animales tratados con anticuerpo anti-TDP-43 humana y de control. Por ejemplo, secciones de tejido de libre flotación se lavan en Tris-Triton a pH 7,4 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0,05 % de Triton X-100), se incuban en 1 % de H₂O₂-PBS durante 30 min y se incuban con una disolución de bloqueo que contiene 2 % de

suero de cabra y caballo normal en Tris-Triton y con 0,2 % de Triton X-100 adicional durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se incuban entonces con IgG anti-humana de burro biotinilado (H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs, 709-065-149) a 1:200 en disolución de bloqueo durante 16 h a 4 °C con agitación a 100 rpm para detectar IgG humana neuronal. El anticuerpo biotinilado unido a tejido se visualiza por reacción cromogénica de peroxidasa usando el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, PK6100, 1:100). La reacción enzimática se detiene con PBS helado y las secciones se lavan en PBS 3 veces. Entonces, las secciones se montan sobre portaobjetos de vidrio y se secan al aire durante la noche antes de contrateñirse con disolución de hemalum (Carl Roth GmbH + Co. T865,1). Después de las etapas de deshidratación, los portaobjetos se cubren con cubreobjetos antes de barrerse con el sistema de microscopio virtual Olympus dotSlide 2,1. La tinción de IgG anti-humana tumoral observada en los animales tratados con anticuerpo, pero no en los animales de control, indica que el anticuerpo anti-TDP-43 humana entra en las neuronas.

Ejemplo 12: Estudio crónico con anticuerpos anti-TDP-43.

Ratones transgénicos TDP-43_G348C (Swamp y col. Brain 134 (2011), 2610-2626) se inyectaron intraperitonealmente con 10 mg/kg, 3 mg/kg de disolución de anticuerpo, o volumen igual

de control de PBS. Cada grupo de tratamiento tiene 20 a 25 ratones. El tratamiento se lleva a cabo una vez a la semana durante 26 semanas. Alternativamente, el tratamiento se lleva a cabo dos veces a la semana durante 13 semanas. El peso corporal se monitoriza cada dos semanas. Los ratones se perfunden bajo anestesia al final del periodo de tratamiento. Se recoge cerebro, médula espinal y sangre. La mitad del cerebro y la médula espinal se fijan posteriormente en 10 % de formalina durante tres días antes de incorporarse en bloque de parafina. Secciones de 4 a 6 μm de espesor cortadas de estos bloques de tejido se usan para estudios de inmunohistoquímica. La otra mitad del cerebro se pesa y se ultracongela a 80 °C para análisis bioquímicos.

Los efectos del fármaco se evalúan comparando el nivel y distribución de TDP-43, que incluye el nivel y distribución de formas patológicas de TDP-43 en animales tratados con anticuerpo y de control usando inmunohistoquímica. Las muestras de tejido obtenidas de animales tratados con anticuerpo y de control se tiñen con un anticuerpo anti-TDP-43, por ejemplo, un anticuerpo anti-TDP-43 específico para formas patológicas de TDP-43, usando procedimientos histológicos convencionales. En una realización, el anticuerpo usado en el análisis histoquímico es el mismo que el anticuerpo administrado a los animales. En otra

realización, el anticuerpo usado en el análisis histoquímico es diferente del anticuerpo administrado a los animales. La eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-TDP-43 humana divulgada en este documento se indica por una reducción en el nivel, o ausencia de formas patológicas, de TDP-43 en animales tratados con anticuerpo con respecto a animales de control.

Los efectos de los fármacos también se evalúan comparando el nivel de TDP-43, que incluye el nivel de formas patológicas de TDP-43 en animales tratados con anticuerpo y de control, usando ELISA o transferencia Western. La eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-TDP-43 humana divulgada en este documento se indica por una reducción en el nivel, o ausencia de formas patológicas, de TDP-43 en animales tratados con anticuerpo con respecto a animales de control.

Esta invención no debe limitarse en alcance por las realizaciones específicas descritas que están previstas como ilustraciones individuales de aspectos individuales de la invención, y cualquier composición o procedimiento que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de esta invención, de hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en este documento, serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la anterior descripción y dibujos adjuntos. Tales

modificaciones pretenden encontrarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-proteína de unión a ADN de TAR de 43 kDa (TDP-43).

5

2. Un anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 que se une específicamente a un polipéptido de TDP-43 que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 10 (a) residuos de aminoácidos 2 a 106 de SEC ID N° 94;
(b) residuos de aminoácidos 99 a 204 de SEC ID N° 94;
(c) residuos de aminoácidos 183 a 273 de SEC ID N° 94;
(d) residuos de aminoácidos 258 a 414 de SEC ID N° 94; y
(e) residuos de aminoácidos 390 a 414 de SEC ID N° 94, en
15 el que la serina está fosforilada en al menos una de las
posiciones 409 y 410.

3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido de
20 TDP-43 que consiste en los residuos de aminoácidos 258 a 414 de SEC ID N° 94, pero no se une al polipéptido AMM321GGG de 258 a 414 de TDP-43.

4. Un anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 que se une específicamente a un polipéptido de TDP-43 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en QYGDVMDVFIP (SEC ID N° 123); AAIGWGSASNA (SEC ID N° 124);

5 DMTEDDELREFF (SEC ID N° 125), EDENDEP (SEC ID N° 126), VQVKKDL (SEC ID N° 127), KEYFSTF (SEC ID N° 128), IIKGISV (SEC ID N° 315), NQSGPSG (SEC ID N° 316), FNGGFGS (SEC ID N° 317), FGNSRGGGAGL (SEC ID N° 318), SNAGSGSGFNG (SEC ID N° 319), QLERSGRFGGN (SEC ID N° 320), EIPSEDD (SEC ID N° 321),

10 FNGGFGSSMDS (SEC ID N° 322), SINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQ (SEC ID N° 323), y cualquier combinación de estas.

5. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido de

15 TDP-43 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGNSRGGGAGL (SEC ID N° 318) y un polipéptido de TDP-43 que comprende la secuencia de aminoácidos de SNAGSGSGFNG (SEC ID N° 319).

20 6. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido de TDP-43 que comprende la secuencia de aminoácidos de SINPAMMAAAQAALQSSWGMMGLASQ (SEC ID N° 323), pero no se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de

SINPGGGAAAQAALQSSWGMMGLASQ (SEC ID N° 314).

7. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que se une específicamente a
5 una forma patológica de TDP-43 humana.

8. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que se une específicamente a cualquier combinación de TDP-43 humana de longitud completa,
10 truncada o patológica en una inmunohistoquímica.

9. Un anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que se une específicamente a TDP-43 citoplásmica o neurítica en tejido de cerebro humano.

15

10. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende una región variable de la cadena pesada VH, en el que la región variable de la cadena pesada comprende una, dos o tres CDR de VH de un
20 anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI205.41D1, NI205.29E11, NI205.9E12, NI205.98H6, NI205.10D3, NI205.44B2, NT205,38H2, NI205.36D5,

NI205.58E11, NI205.14H5, NI205.31D2, NI205.8F8, NI205.31C11,
NI205.8C10, NI205.10H7, NI205.1A9, NI205.14W3 y NI205.19G5.

11. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la
5 reivindicación 10 que comprende una CDR1 de VH, CDR2 de VH y
CDR3 de VH de un anticuerpo seleccionado del grupo que
consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-
205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-
205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI-205.41D1,
10 NI-205.29E11, NI-205.9E12, NI-205.98H6, NI-205.10D3, NI-
205.44B2, NI-205.38H2, NI-205.36D5, NI-205.58E11, NI-
205.14H5, NI-205.31D2, NI-205.8F8, NI-205.31C11, NI-205.8C10,
NI-205.10H7, NI-205.1A9, NI-205.14W3 y NI205.19G5.

15 12. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la
reivindicación 10 que comprende una o más de:

(a) una CDR1 de VH seleccionada del grupo que consiste en:
SEC ID N° 11, 19, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 131,
139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220,
20 228, 236, 244, 252, 260 y 268

(b) una CDR2 de VH seleccionada del grupo que consiste en:
SEC ID N° 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132,
140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205, 213, 221,
229, 237, 245, 253, 261 y 269; y

(c) una CDR3 de VH seleccionada del grupo que consiste en:
 SEC ID N° 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81 90, 133,
 141 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222,
 230, 238, 246, 254, 262 y 270.

5

13. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la
 reivindicación 11 que comprende:

(a) una CDR1 de VH seleccionada del grupo que consiste en:

SEC ID N° 11, 19, 28, 37, 46, 54, 62, 70, 79, 88, 131
 10 139, 147, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220,
 228, 236, 244, 252, 260 y 268

(b) una CDR2 de VH seleccionada del grupo que consiste en:

SEC ID N° 4, 12, 20, 29, 38, 47, 55, 63, 71, 80, 89, 132,
 140, 148, 157, 165, 173, 181, 189, 197, 205, 213, 221,
 15 229, 237, 245, 253, 261 y 269; y

(c) una CDR3 de VH seleccionada del grupo que consiste en:

SEC ID N° 5, 13, 21, 30, 39, 48, 56, 64, 72, 81 90, 133,
 141, 149, 158, 166, 174, 182, 190, 198, 206, 214, 222,
 230, 238, 246, 254, 262 y 270.

20

14. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la
 reivindicación 13 que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3
 de VH de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste
 en: NI-205.3F10, NI-205.51C1 NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-

205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-
 205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI-205.41D1, NI-
 205.29E11, NI-205.9E12, NI-205.98H6, NI-205.10D3, NI-
 205.44B2, NI-205.38H2, NI-205.36D5, NI-205.58E11 NI-205.14H5,
 5 NI-205.31D2, NI-205.8F8, NI-205.31C11, NI-205.8C10, NI-
 205.10H7, NI-205.1A9, NI-205.14W3 y NI-205.19G5, en el que
 CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH se definen como se
 enumera en la Tabla 2.

10 15. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de una cualquiera
 de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende una región
 variable de la cadena ligera VL, en el que la región variable
 de la cadena ligera comprende una, dos o tres CDR de VL de un
 anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: NI-
 15 205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12,
 NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-
 205.68G5, NI-205.20A1, NI-205.41D1, NI-205.29E11 NI-205.9E12,
 NI-205.98H6, NI-205.10D3, NI-205.44B2, NI-205.38H2, NI-
 205.36D5, NI-205.58E11, NI-205.14H5, NI-205.31D2, NI-205.8F8,
 20 NI-205.31C11, NI-205.8C10, NI-205.10H7, NI-205.1A9, NI-
 205.14W3 y NI-205.19G5.

16. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la
 reivindicación 15 que comprende una CDR1 de VL, CDR2 de VL y

CDR3 de VL de un anticuerpo seleccionado del grupo que
 consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-
 205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-
 205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI-205.41D1
 5 NI-205.29E11, NI-205.9E12, NI-205.98H6, NI-205.10D3, NI-
 205.44B2, NI-205.38H2, NI-205.36D5, NI-205.58E11 NI-205.14H5,
 NI-205.31D2, NI-205.8F8, NI-205.31C11, NI-205.8C10, NI-
 205.10H7, NI-205.1A9, NI-205.14W3 y NI-205.19G5.

10 17. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la
 reivindicación 15 que comprende una o más de

(a) una CDR1 de VL seleccionada del grupo que consiste en:
 SEC ID N° 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135,
 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224,
 15 232, 240, 248, 256, 264, 272 y 326;

(b) una CDR2 de VL seleccionada del grupo que consiste en:
 SEC ID N° 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136,
 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201, 209, 217, 225,
 233, 241 249, 257, 265, 273 y 327; y

20 (c) una CDR3 de VL seleccionada del grupo que consiste en:
 SEC ID N° 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137,
 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226,
 234, 242, 250, 258, 266, 274 y 328.

18. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la reivindicación 17 que comprende:

(a) una CDR1 de VL seleccionada del grupo que consiste en:

SEC ID N° 7, 15, 23, 32, 42, 50, 58, 66, 74, 84, 91, 135,
 5 143, 152, 160, 168, 176, 184, 192, 200, 208, 216, 224,
 232, 240, 248, 256, 264, 272 y 326;

(b) una CDR2 de VL seleccionada del grupo que consiste en:

SEC ID N° 8, 16, 24, 33, 43, 51, 59, 67, 75, 85, 92, 136,
 144, 153, 161, 169, 177, 185, 193, 201 209, 217, 225,
 10 233, 241, 249, 257, 265, 273 y 327; y

(c) una CDR3 de VL seleccionada del grupo que consiste en:

SEC ID N° 9, 17, 25, 34, 44, 52, 60, 68, 76, 86, 93, 137,
 145, 154, 162, 170, 178, 186, 194, 202, 210, 218, 226,
 15 234, 242, 250, 258, 266, 274 y 328.

15

19. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la reivindicación 18 que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3

de VL de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste

en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-

20 205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-

205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI-205.41D1, NI-

205.29E11, NI-205.9E12, NI-205.98H6, NI-205.10D3, NI-

205.44B2, NI-205.38H2, NI-205.36D5, NI-205.58E11, NI-

205.14H5, NI-205.31D2, NI-205.8F8, NI-205.31C11, NI-205.8C10,

NI-205.10H7, NI-205.1A9, NI-205.14W3 y NI-205.19G5, en el que CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL se definen como se enumera en la Tabla 2

5 20. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 que comprende una región variable de la cadena pesada VH al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°
10 1, 10, 18, 26, 35, 45, 53, 61, 69, 77, 87, 130, 138, 146, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 211, 219, 227, 235, 243, 251, 259 y 267.

21. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la
15 reivindicación 20, en el que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N° 1, 10, 18, 26, 35, 45, 53, 61, 69, 77, 87, 130, 138, 146, 155, 163, 171, 179, 187, 195, 203, 21 1, 219, 227, 235, 243, 251, 259 y 267.

20

22. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que comprende una región variable de la cadena ligera VL al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de

aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N° 6, 14, 22, 31 40, 49, 57, 65 ,73, 82, 122, 134, 142, 150, 151, 159, 167, 175, 183, 191 199, 207, 215, 223, 231, 239, 247, 255, 263 y 271.

5

23. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de la reivindicación 22, en el que la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N° 6, 14, 22, 31, 40, 49,
10 57, 65, 73, 82, 122, 134, 142, 150, 151, 159, 167, 175, 183, 191, 199, 207, 215, 223, 231, 239, 247, 255, 263 y 271.

24. El anticuerpo monoclonal anti-TDP-43 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende un par de VH y
15 VL seleccionado del grupo que consiste en: una VH de SEC ID N° 1 y una VL de SEC ID N° 6, una VH de SEC ID N° 10 y una VL de SEC ID N° 14, una VH de SEC ID N° 18 y una VL de SEC ID N° 22, una VH de SEC ID N° 26 y una VL de SEC ID N° 31, una VH de SEC ID N° 35 y una VL de SEC ID N° 40, una VH de SEC ID N°
20 45 y una VL de SEC ID N° 49, una VH de SEC ID N° 53 y una VL de SEC ID N° 57, una VH de SEC ID N° 61 y una VL de SEC ID N° 65, una VH de SEC ID N° 69 y una VL de SEC ID N° 73, una VH de SEC ID N° 77 y una VL de SEC ID N° 82, una VH de SEC ID N° 87 y una VL de SEC ID N° 122, una VH de SEC ID N° 130 y una

VL de SEC ID N° 134, una VH de SEC ID N° 138 y una VL de SEC ID N° 142, una VH de SEC ID N° 146 y una VL de SEC ID N° 150, una VH de SEC ID N° 146 y una VL de SEC ID N° 151, una VH de SEC ID N° 155 y una VL de SEC ID N° 159, una VH de SEC ID N° 163 y una VL de SEC ID N° 167, una VH de SEC ID N° 171 y una VL de SEC ID N° 175, una VH de SEC ID N° 179 y una VL de SEC ID N° 183, una VH de SEC ID N° 187 y una VL de SEC ID N° 191, una VH de SEC ID N° 195 y una VL de SEC ID N° 199, una VH de SEC ID N° 203 y una VL de SEC ID N° 207, una VH de SEC ID N° 211 y una VL de SEC ID N° 215, una VH de SEC ID N° 219 y una VL de SEC ID N° 223, una VH de SEC ID N° 227 y una VL de SEC ID N° 231, una VH de SEC ID N° 235 y una VL de SEC ID N° 239, una VH de SEC ID N° 243 y una VL de SEC ID N° 247, una VH de SEC ID N° 251 y una VL de SEC ID N° 255, una VH de SEC ID N° 259 y una VL de SEC ID N° 263, y una VH de SEC ID N° 267 y una VL de SEC ID N° 271.

25. Un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítoto de TDP-43 que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI-205.41D1, NI-205.29E11, NI-205.9E12, NI-205.98H6, NI-205.10D3, NI-205.44B2, NI-205.38H2, NI-205.36D5, NI-205.58E11, NI-

205.14H5, NI205.31D2, NI-205.8F8, NI-205.31C11, NI-205.8C10,
NI-205.10H7, NI-205.1A9, NI-205.14W3 y NI-205.19G5.

26. Un anticuerpo monoclonal que compite por la unión
5 específica a TDP-43 con un anticuerpo seleccionado del grupo
que consiste en: NI-205.3F10, NI-205.51C1, NI-205.21G2, NI-
205.8A2, NI-205.15F12, NI-205.113C4, NI-205.25F3, NI-
205.87E7, NI-205.21G1, NI-205.68G5, NI-205.20A1, NI-205.41D1,
NI-205.29E11, NI-205.9E12, NI-205.98H6, NI-205.10D3, NI-
10 205.44B2, NI-205.38H2, NI-205.36D5, NI-205.58E11, NI-
205.14H5, NI-205.31D2, NI-205.8F8, NI-205.31C11, NI-205.8C10,
NI-205.10H7, NI-205.1A9, NI-205.14W3 y NI-205.19G5.

27. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones
15 2 a 26, que es un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado,
anticuerpo quimérico o anticuerpo murinizado.

28. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones
1 a 27, que es un fragmento de anticuerpo de unión un
20 antígeno.

29. El anticuerpo de la reivindicación 28, en el que el
fragmento de anticuerpo está seleccionado del grupo que
consiste en un fragmento Fv monocatenario (scFv), un

fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂.

30. Un polipéptido aislado que comprende una VH y/o una VL
del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a
5 29.

31. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de
nucleótidos que codifica el polipéptido de la reivindicación
30.
10

32. El polinucleótido de la reivindicación 31 que comprende
una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que
consiste en: SEC ID N° 95 a 116 y 275 a 310.

15 33. Un vector que comprende el polinucleótido de las
reivindicaciones 31 ó 32.

34. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de
las reivindicaciones 31 ó 32 o el vector de la reivindicación
20 33.

35. Un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-TDP-43
o cadena(s) de inmunoglobulina de este, comprendiendo dicho
procedimiento

- (a) cultivar la célula de la reivindicación 34; y
- (b) aislar dicho anticuerpo o cadena(s) de inmunoglobulina de este del cultivo.

5 36. Un anticuerpo obtenido mediante el procedimiento de la reivindicación 35.

37. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 ó 36, que está detectablemente marcado.

10

38. El anticuerpo de la reivindicación 37, en el que la marca detectable está seleccionada del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado.

15 39. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 ó 36 a 38, que está unido a un fármaco.

40. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 ó 36 a 39.

20 41. La composición de la reivindicación 40, que es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

42. La composición de la reivindicación 41, que es una

vacuna.

43. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 41 ó
42 que comprende además un agente adicional útil para tratar
5 una proteinopatía de TDP-43.

44. La composición de la reivindicación 40, que es una
composición de diagnóstico, y opcionalmente comprende
reactivos convencionalmente usados en procedimientos
10 inmunológicos o de diagnóstico basados en ácidos nucleicos.

45. Un procedimiento para tratar una proteinopatía de TDP-43
en un sujeto en necesidad de este, que comprende administrar
una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de una
15 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 ó 36 a 39.

46. Uso de un anticuerpo de una cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 29 ó 36 a 39 para la preparación de una
composición farmacéutica o de diagnóstico para tratamiento
20 profiláctico y terapéutico, monitorización de la progresión o
monitorización de la respuesta a un tratamiento de una
proteinopatía de TDP-43 en un sujeto.

47. Un procedimiento de diagnóstico de una proteinopatía de

TDP-43 en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- (a) evaluar el nivel de TDP-43 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse con anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 ó 36 a 398; y
- 5 (b) comparar el nivel de TDP-43 con un patrón de referencia que indica el nivel de TDP-43 en uno o más sujetos de control,

en el que una diferencia o similitud entre el nivel de TDP-43 y el patrón de referencia indica que el sujeto padece una
10 proteinopatía de TDP-43.

48. El uso de la reivindicación 46 o el procedimiento de las reivindicaciones 45 ó 47, en el que la proteinopatía de TDP-43 está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de
15 granos argirófilos, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), complejo de ALS-parkinsonismo-demencia de Guam, degeneración corticobasal, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de las neuronas motoras,
20 degeneración lobar frontotemporal (FTLD), demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina, esclerosis hipocámpica, miopatía de cuerpos de inclusión, miositis de cuerpos de inclusión, enfermedad de Parkinson, demencia por

enfermedad de Parkinson, complejo de Parkinson-demencia en la península de Kii y enfermedad de Pick.

49. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 29 ó 36 a 39 para la preparación de una composición para la detección *in vivo* de o elección como diana de un agente terapéutico y/o de diagnóstico para TDP-43 en el cuerpo humano o animal.

10 50. El uso de la reivindicación 49, en el que dicha obtención de imágenes *in vivo* comprende tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de un único fotón (SPECT), obtención de imágenes ópticas de infrarrojo cercano (NIR) o resonancia magnética nuclear (MRI).

15

51. Un kit útil en el diagnóstico o monitorización de la progresión de una proteinopatía de TDP-43, comprendiendo dicho kit al menos un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 ó 36 a 39.

20

RESUMEN

Se proporcionan nuevas moléculas de unión específica a TDP-43 incluyendo polipéptidos tales como anticuerpos
5 humanos, así como fragmentos, derivados y variantes de estos. También se proporcionan métodos relacionados con estas moléculas de unión específica a TDP-43. También se divulgan ensayos, kits y soportes sólidos relacionados con moléculas de unión específica a TDP-43, incluyendo polipéptidos tales
10 como anticuerpos humanos. La molécula de unión específica a TDP-43, anticuerpo, cadena o cadenas de inmunoglobulina, así como fragmentos de unión, derivados y variantes de estos pueden usarse en composiciones farmacéuticas y de diagnóstico para inmunoterapia y diagnóstico dirigido a TDP-43,
15 respectivamente.

Figura 1A-C**Fig. 1A**

NI-205.3F10-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 1, 2))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLLESvGGDLVQFGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAPGKGLEWVSALSRTGDYTWYAD
-----FR3-----CDR3-----JH-----
SVRGRFTVSRDDSKNIFYLEMNSLRAEDTAVYYCAKNYYSSFGYNWAAFHIWGQGTMTVTVSS
```

NI-205.3F10-VK (secuencia de cadena ligera variable VK (SEC ID N°: 6))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EIVLTQSPGTLvSLSPGERATLSCRASQDVNNNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGVPDR
-----FR3-----CDR3-----JK-----
FSGRSGTGDTFTLTINRLEPEDFAMYFCQQYGGSPPYTFGQGTKLEIK
```

Fig. 1B

NI-205.51C1-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 10))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCTTSGFIFSDYWMHWVRQAPGKGLTWVSRINLDGSDTI
-----FR3-----CDR3-----JH-----
YADSVKGRFTISRDNvDKNTLYLQMNSLRVEDTAIYYCARSRKSVWGQGTMTVTVSS
```

NI-205.51C1-VL (secuencia de cadena ligera variable VL (SEC ID N°: 14))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSNTDVGAYDYVSWSQQLPGKAPKFVIFDvVDVVRPSGIS
-----FR3-----CDR3-----JL-----
DRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCvSSYTKSGTLVFGGGTKVTVV
```

Fig. 1C

NI-205.21G2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 18))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVvSCKTSGYSFTSYTLHWVRQAPGHRPEWMGWvINAAAFINT
-----FR3-----CDR3-----JH-----
KYSQKFQGRITLTvTRDTSANIAYLELRSLTTEDTAVYYCARRASGSNGLDVWGQGTMTVTVSS
```

NI-205.21G2-VK (secuencia de cadena ligera variable VK (SEC ID N°: 22))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
DIQMTQSPSSvSLASVGDRIITITCQASRDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASYLETG
FR3-----CDR3-----JK-----
VPSTFSGSGSGTHFTLTISvSLQPDvDFATYYCQvQYDSVPLTFGGGTKVEIK
```

Figura 1D-F**Fig. 1D**

NI-205.8A2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 26, 27))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2--
QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFRDHGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWL DGSS
E
-----FR3-----CDR3-----JH--
RFYADSV EGRFTISRDN SKNTLYLQLTSLRAEDTAIYYCARDRVASEGTAFDVWGQGTMTVTVSS
T
```

NI-205.8A2-VK (secuencia de cadena ligera variable VK (SEC ID N°: 31))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCWASQNVNHYLVWYQQRPGQAPRLLLYDTSVRAAGIP
-----FR3-----CDR3-----JK--
ARFIGSGSGTHFTLTISLLEPEDSAVYYCQHRSDWTFGQGTKVEIK
```

Fig. 1E

NI-205.15F12-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 35, 36))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2--
QVQLVQSGTAVKKPGASVKVSKASGFSFNGYYMHVVRQAPGQGLEWMGVINP NGG
E      E
-----FR3-----CDR3-----JH----
STNYAQKF KGRITMSADTPARSVSMELGSLRSDDTAMYYCARLPVNIEVL DLWGQGT LVTVSS
```

NI-205.15F12-VK (secuencia de cadena ligera variable VK (SEC ID N°: 40, 41))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2
D E V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R S S Q T V L F S S N D K N Y L A W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S V
E      L
-----FR3-----CDR3-----JK----
R A S G V P D R F S G S G S G T D F S L T I N G L Q A E D V A V Y Y C Q Q S S T A P L T F G G G T K V E I K
```

Fig. 1F

NI-205.113C4-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 45))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2--
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYMHVVRQAPGQGLEWMGIINP SGGR
-----FR3-----CDR3-----
T S Y A Q K F Q G R A S M T R D T S T S T V Y M E V I S L R S E D T A V Y Y C A R Q R P S G Y S G Y G P S E S Y G N P
-----JH-----
T D D A F D V W G Q G T T V T V S S
```

NI-205.113C4-VL (secuencia de cadena ligera variable VL (SEC ID N°: 49))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3
S Y V L F T Q P P S V S V A P G Q T A R I T C G G N N I G S R G V H W Y Q Q R P G Q A P V L V V Y D D S D R P S G I P E
-----CDR3-----JL--
R F S G S N S G D T A T L T I S R V E V G D E A D Y Y C Q V W D N S S D H L V V F G G G T K L T V L
```

Figura 1G-I**Fig. 1G**

NI-205.25F3-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 53, 129))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNK
E
-----FR3-----CDR3-----
YYPDSVKGRFTISRDNMNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARDTYQYDSSTYYPYFYYG
-----JH-----
MDVWGQGTTVTVSS
```

NI-205.25F3-VL (secuencia de cadena ligera variable VL (SEC ID N°: 57))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSDDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGV
-----FR3-----CDR3-----JL-----
SSRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCSSFASSTISVTFGGGTKLTVL
```

Fig. 1H

NI-205.87E7-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 61))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGDRT
-----FR3-----CDR3-----
YSADSVKGRFTISRDNMNTLYLQINSLRVEDTAVYYCAQGGGGEMTAVTMDGTYYG
-----JH-----
MDVWGQGTTVTVSS
```

NI-205.87E7-VL (secuencia de cadena ligera variable VL (SEC ID N°: 65))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QSALTQPRSVSGSPGQSITISCTGTSSNVGTYKFVSWYQQHPGKAPKLMIDVTKRPSGV
-----FR3-----CDR3-----JL-----
PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSYTYVFGSGTKVTVL
```

Fig. 1I

NI-205.21G1-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 69))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
QVQLVESGGGVVQPGMSLRLSCAASGFSFSSHGMHWVRQTPGKGLEWLAVISYDASNK
-----FR3-----CDR3-----JH-----
SYADSVKGRFTISRDNMNTLYLQMDSLRVEDTALYYCANAFSSSASGGYWGQGLTVTVSS
```

NI-205.21G1-VK: (secuencia de cadena ligera variable VK (SEC ID N°: 73))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
DVVMTQSPLSLPVTELGQPASISCRSSQSLVHSDGVTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRD
FR3-----CDR3-----JK---
SGVPDRFSGSGSGTDFTLEISRVEAEDVGIYYCMQGTHTWPPWTFGQGTKVEIK
```

Figura 1J-K**Fig. 1J**

NI-205.68G5-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 77, 78))

```
FR1-----CDR1----FR2-----CDR2---
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIYYDSSQR
E
-----FR3-----CDR3-----
YYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLR AEDTALYYCARDLPFHYHRSASFAPSDTW
JH-----
GQGT LVT VSS
```

NI-205.68G5-VK (secuencia de cadena ligera variable VK (SEC ID N°: 82, 83))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQAVTNNYLA WYQQKPGQAPRLLVYAASSRATGIP
M
FR3-----CDR3-----JK--
RFYGS GSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPITFGQGTRLEIK
```

Fig. 1K

NI-205.20A1-VH (secuencia de cadena pesada variable VH (SEC ID N°: 87))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQAVTNNYLA WYQQKPGQAPRLLVYAASSRATGIP
M
FR3-----CDR3-----JK--
RFYGS GSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPITFGQGTRLEIK
```

NI-205.20A1-VK (secuencia de cadena ligera variable VK (SEC ID N°: 122))

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2----FR3
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD
-----CDR3-----JK-----
RFSGSGSGTDFTLTITIRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGQGTKVEIK
```

Figura 2A-F

Fig. 2A

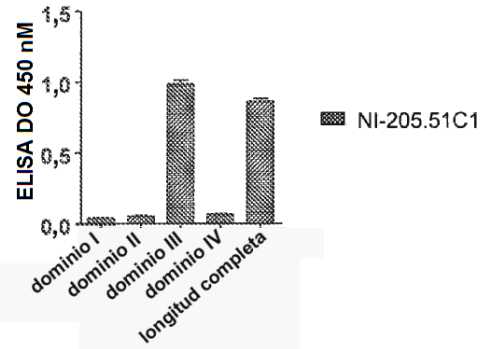


Fig. 2B

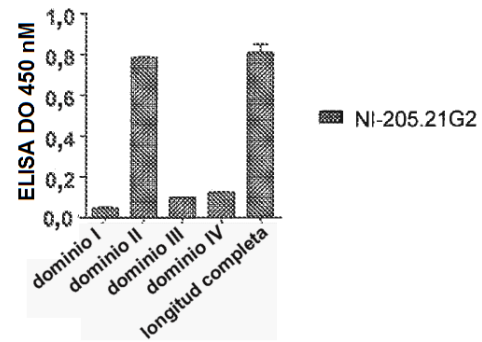


Fig. 2C

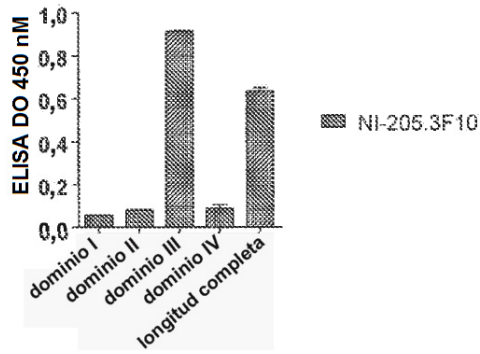


Fig. 2D

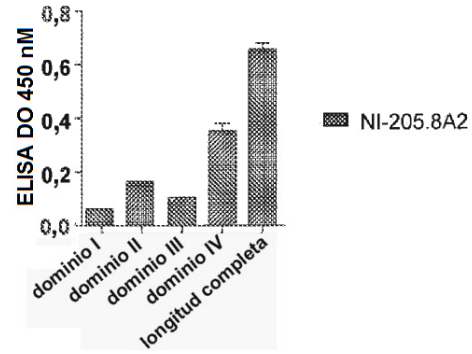


Fig. 2E

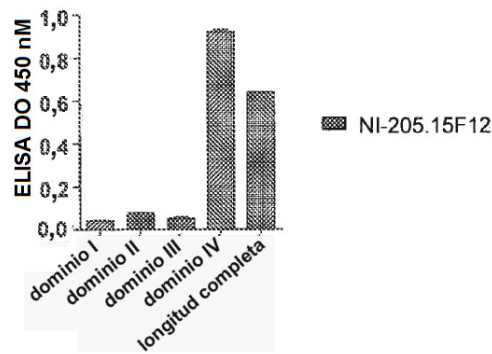


Fig. 2F

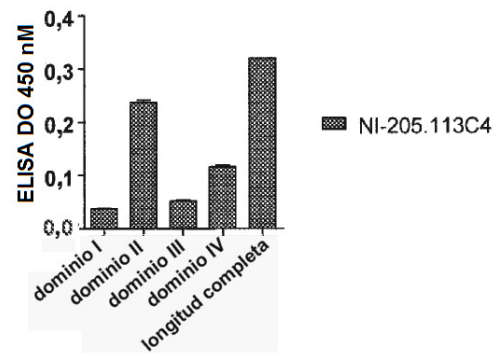


Figura 2G-J

Fig. 2G

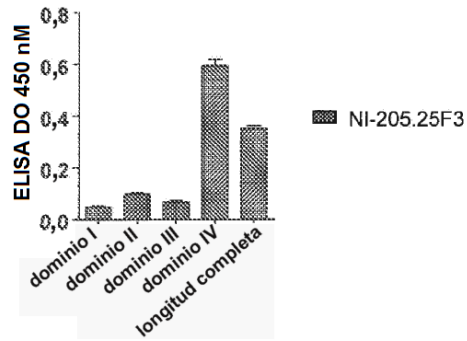


Fig. 2H

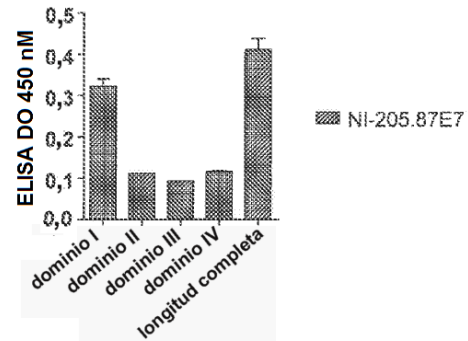


Fig. 2I

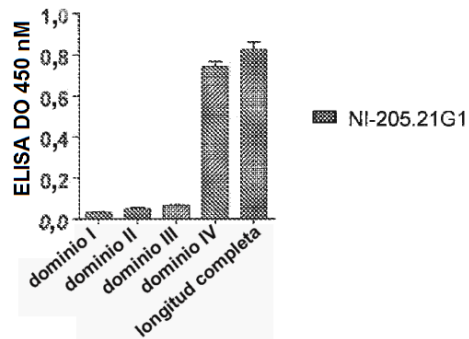


Fig. 2J

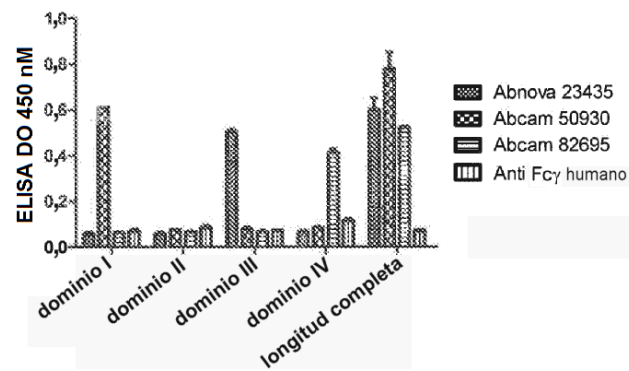


Figura 3A-C**Fig. 3A**

NI-205.41D1-VH (SEC ID N°: 130):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYYMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTIS
 RDNARNSLYLQMHSRLRAEDTAVYYCASPPGWWGQGT~~LVTVSS~~

NI-205.41D1-VK (SEC ID N°: 134)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSG
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPVTFGGGTKVEIK

Fig. 3B

NI-205.29E11-VH (SEC ID N°: 138):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYFIHWIRQAPGQGLEWMGWIKPKSGGTDYAEKFQGRVTL
 TRDTSITTVMELSRNLNSDDTAVYYCARLKYSVPDSDYWGQGT~~LVTVSS~~

NI-205.29E11-VK (SEC ID N°: 142):

DVVMQTQSPLSLPVTLGQSASISCRSSQGLVHSDGNTYLNWFHQRPQGQSPRRLIYKVFNRDSGVSDRFSGSGS
 GSDFTLMISRVEAEDVGIYYCMQGT~~LWPLTFGQGT~~KVEIK

Fig.3C

NI-205. 9E12-VH (SEC ID N°: 146):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFNFSNVWISWVRQAPGKGLEWVGRIKSKNDGGTTEYAAPVKGRF
 TISRDDSKNTVYLMNSLKTEDAGVYYCTTDPYHYFDMGGPGFGPWGQGT~~LVTVSS~~

NI-205. 9E12A-VK (SEC ID N°: 150):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSGQSVLYRSNNRNYIAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG
 SGTDFLT~~LISS~~QAEDVAVYYCQQYYSNRWTFGQGT~~KVEIK~~

NI-205.9E12D-VK (SEC ID N°: 151)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVSYSSNNKNFLSWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG
 SGTDFLT~~LISS~~QAEDVAVYYCQQYSSLPISFGQGT~~RLEIK~~

Figura 3D-F**Fig. 3D**

NI-205.98H6-VH (SEC ID N°: 155):

EVQLLES^{GG}GALVQPGGSLRLSCAASGLTFSRHAFSWVRQAPGKGLEWVAISSGSGGNTYYAASVKGRFTISR
DESKNTLYLQMNSLRVEDTALYYCAKEVLEWSLLSR^{YMDV}WGKGTTTVTVSS

NI-205.98H6-VL (SEC ID N°: 159):

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGGNTVNWYHQLPGTAPKLLVYSTNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLQAEDEADYYCATWDDSLNGWVFGGGTKLTVL

Fig. 3E

NI-205.10D3-VH (SEC ID N°: 163):

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSITDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIHDSGTTRYNPSLTSRLSMSLDT
STNQVSLRLTSVTAADTAVYYCAKVPDYWGQGT^{LV}TVSS

NI-205.10D3-VK (SEC ID N°: 167)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYNSDNKNYLAWLQKPGQPPKVLIIYWASTREFGVPDRFSGS
GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQYYSVPFTFGGGTKVEIK

Fig. 3F

NI-205.44B2-VH (SEC ID N°: 171):

QVQLQESGPGVVKPSQTL^{SL}CTVSGVSVGSGDYYWSWIRHHPGKGLEWIGYISFFGSSNYP^{SL}KGRVSM
SVDTSN^{QFSL}NLKS^{VTAADTAVYFCATGNAYSEW}GQGTMTVTVSS

NI-205.44B2-VL (SEC ID N°: 175)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGTHNLVSWYQQHPGKAPKLIIEIFERPSSGISSRFTGSKSGNTASLT
ISGLQAEDEADYFCCAYS^{VT}VIFGGGTKLTVL

Figura 3G-I**Fig. 3G**

NI-205.38H2-VH (SEC ID N°: 179):

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCTASGFNLGDYWMHWVRQVPKGKLVWVSRISSDGASVSYADFVEGRFTI
SRGNARNTLFLELNSRLDDTAVYYCAMGVVWGQGTlVTVSS

NI-205.38H2-VL (SEC ID N°: 183)

SYELTQPPSVSVSPGQTATISCSGDALPKRYAYWYKQKSGQVPVLIYEDNKRPSGIPARFSGSSSGTMATLTI
TGAQVDDEADYYCYSSDNSDTYSVFGGGTKLTVL

Fig. 3H

NI-205.36D5-VH (SEC ID N°: 187):

QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASRFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVALIYYDATQKYADSVKGRFTIS
RDNSKNALYLQMTSLRADDTAVYYCARDLPYHYHRSASFAPADTWGQGTlVTVSS

NI-205.36D5-VK (SEC ID N°: 191):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTISNNYLAWYQQKPGQAPRLLVYAASSRATGIPDRFYGSGSGADFTL
TISRLEPEDFVVYYCQYGGSPITFGQGTREIK

Fig. 3I

NI-205.58E11-VH (SEC ID N°: 195):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEWVATVGYGGTIYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLEMNSLRAEATAVYYCAKANYGGNRFGLDVWGQGTlVTVSS

NI-205.58E11-VL (SEC ID N°: 199):

QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHQP GKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSGSKSGN
TASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNLGVFGTGTEVTVL

Figura 3J-L**Fig. 3J**

NI-205.14H5-VH (SEC ID N°: 203):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMAWVRQAPGKGLEWVSAIPARGDKTYADSVRGRFTIS
RDISKSALYLQMNSLRVEDTAVYYCAKAHHLYNKNFDYWGQGTLLTVSS

NI-250.14H5-VK (SEC ID N°: 207)

EIVLTQSPGTLSLSPGETVTLSRCASQSVSSSNLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGRSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQHYGTFGQGTKVDIK

Fig. 3K

NI-205.31D2-VH (SEC ID N°: 211):

EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYVMSWVRQAPGKGLEWVSAISRRGGSTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRWLTGRTGGVFDIWGQGTMTVTVSS

NI-205.31D2-VK (SEC ID N°: 215):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTF
TISSLQPEDTATYYCQQYDNLPLTFGGGTKVEIK

Fig. 3L

NI-205.8F8-VH (SEC ID N°: 219):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGDSGSTTHYADSVKGRFTISR
DNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLGPVAAIGDYWGQGTLLTVSS

NI-205.8F8-VL (SEC ID N°: 223):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNNVYQQLPGTAPKLLVYRNNQRPSGVPDRVSGSKSGSSA
SLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLRGYVFGTGTKVTVL

Figura 3M-O**Fig. 3M**

NI-205.31C11 VH (SEC ID N°: 227):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFDNYGMHWVRQAPGKGLEWLAVISYGGDHQFYGDSVKDRFT
ISRDN5KNTAYLQMHSRLRPDDTAVYYCATGVTPDEFWQGGLTVTVSS

NI-205.31C11 VK (SEC ID N°: 231)

DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSHRDSGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDVGVVYCLQGTHWPPFTFGQGTRLEIK

Fig. 3N

NI-205.8C10 VH (SEC ID N°: 235):

EVQLVESGGGLVNPGGSLRLSCTASGFSFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSLITSSGSYIYYADSVKGRFTISR
DAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCANMLAAAGSHYFHYWGQGLTVTVSS

NI-205.8C10 VK (SEC ID N°: 239):

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISERFSGVPDRFSGSGAG
TDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQVTQFPITFGQGTRLEIK

Fig. 3O

NI-205.10H7 VH (SEC ID N°: 243):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKKYYGDSVKGRFT
ISRDNPKNTLYLQMNSLRVEDTAIYYCVPDAFDMWGQGTMTVTVSS

NI-205.10H7 VK (SEC ID N°: 247):

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHTDGKTYLSWLHQRPGQPPRPLIYKMSKRFSGVPDRFSGSGA
ETEFTLKISRVEAEDVGIYYCLQLTQFPITFGQGTRLEIK

Figura 3P-R**Fig 3P**

NI-205.1A9 VH (SEC ID N°: 251):

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRF
VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRIDGSSWSSWFDPWGQGTLVTVSS

NI-205.1A9 VL (SEC ID N°: 255):

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTS
ASLAITGLQAEDEADYYCQSFDSSLSSSVFGGGTKLTVL

Fig. 3Q

NI-205.14W3 VH (SEC ID N°: 259):

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYPVNNYAINWVRQAPGQGLEWMGFINTNTGIPTYAQGFTGRFV
SLDTSVNTAYLQISGLKADDTAVYYCARVGIVGVIVFDYWGQGTLVTVSS

DVVMQTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSSKNKNHLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYSPSVTFGGGTKVEIK

NI-205.14W3 VK (SEC ID N°: 263)

Fig. 3R

NI-205.19G5 VH (SEC ID N°: 267):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIYYDSSQRYYADSVKGRFTIS
RDNSKNALYLQMNSLRAEDTALYYCARDLPFHYHRSASFAPSDTWGQGTLVTVSS

NI-205.19G5 VK (SEC ID N°: 271):

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQAVTNNYLAWYQQKPGQAPRLLVYAAASSRATGIPDRFYGSGSGADFT
LTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPITFGQGTRLEIK

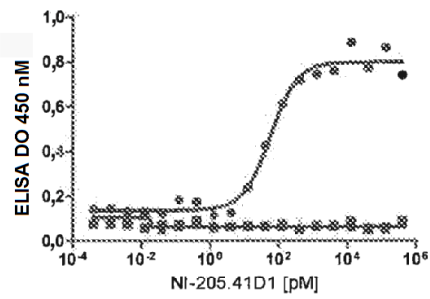
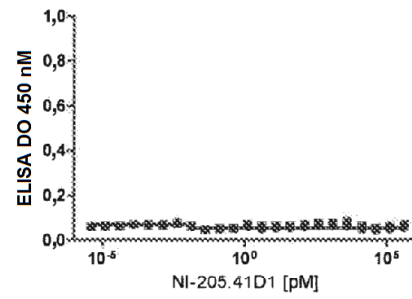
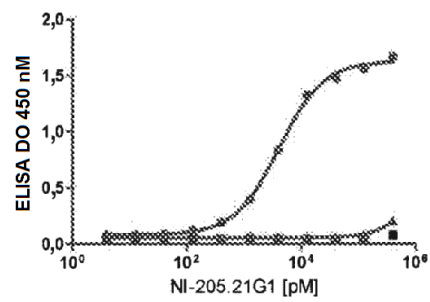
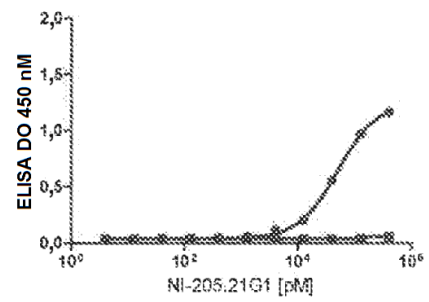
Figura 4A, B, E y F**Determinación de la afinidad de unión (CE_{50}) para TDP-43 humana****A)****E)****B)****F)**

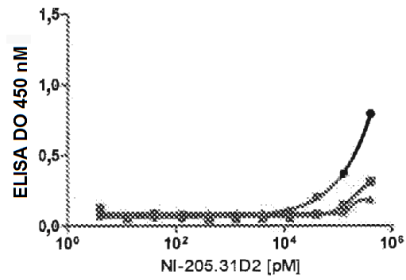
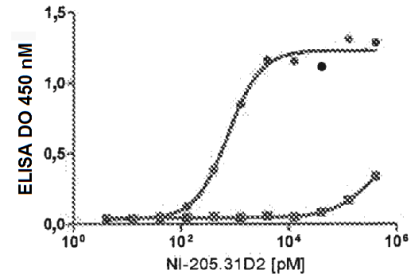
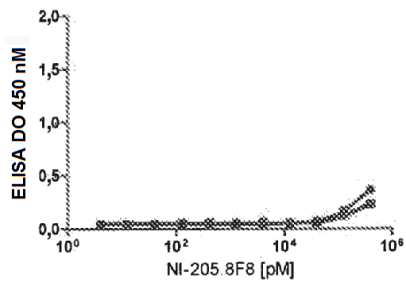
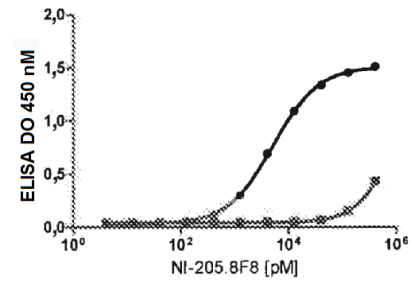
Figura 4C, D, G y H**Determinación de la afinidad de unión (CE_{50}) para TDP-43 humana****C)****G)****D)****H)**

Figura 5A-I

Unión con distintos dominios de TDP-43

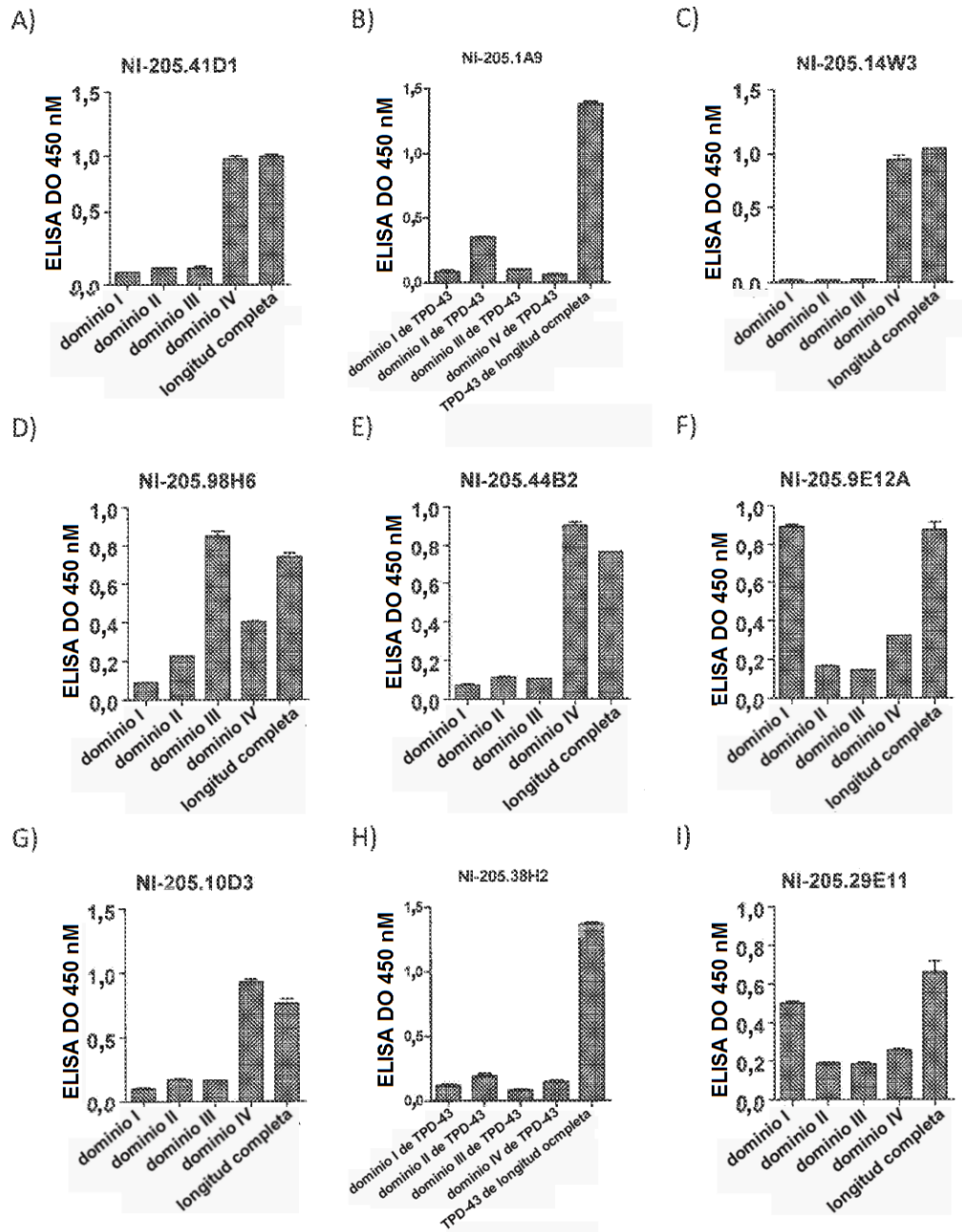
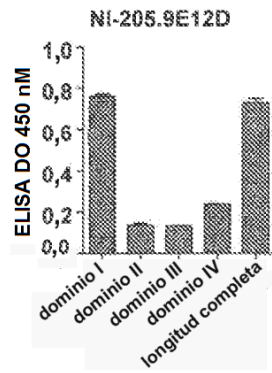


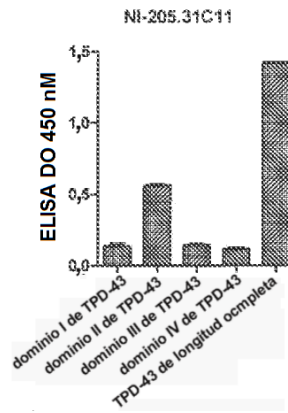
Figura 5J-M

Unión con distintos dominios de TDP-43

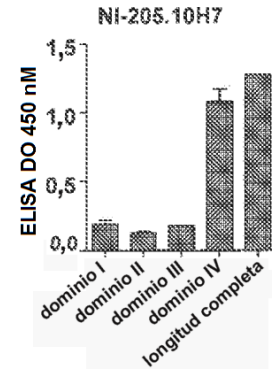
J)



K)



L)



M)

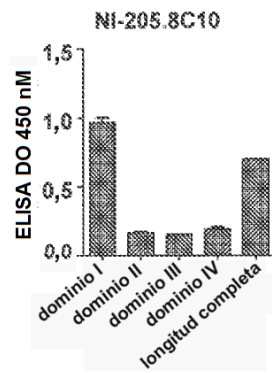


Figura 6A-C
Unión con distintos dominios de TDP-43 por inmunotransferencia

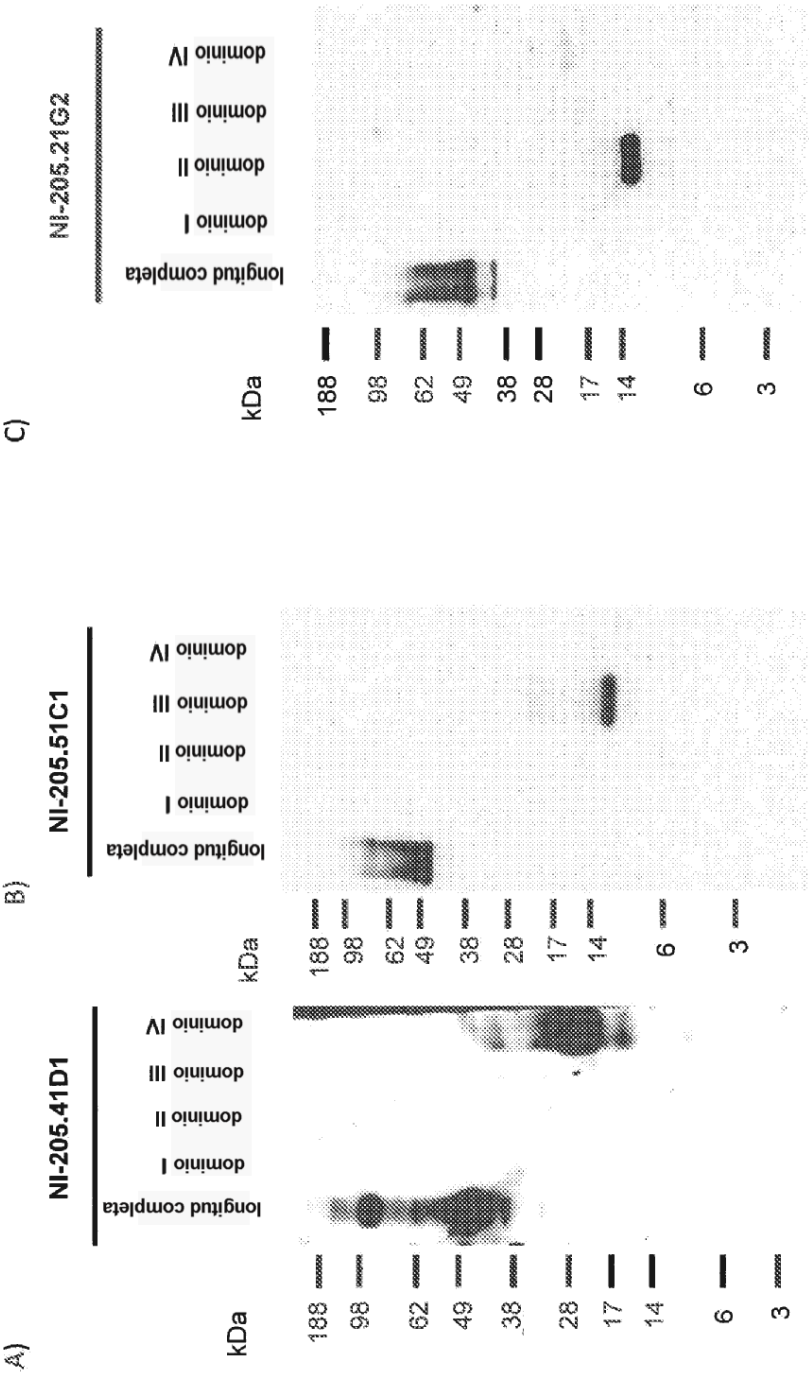


Figura 6D-F
Unión con distintos dominios de TDP-43 por inmunotransferencia

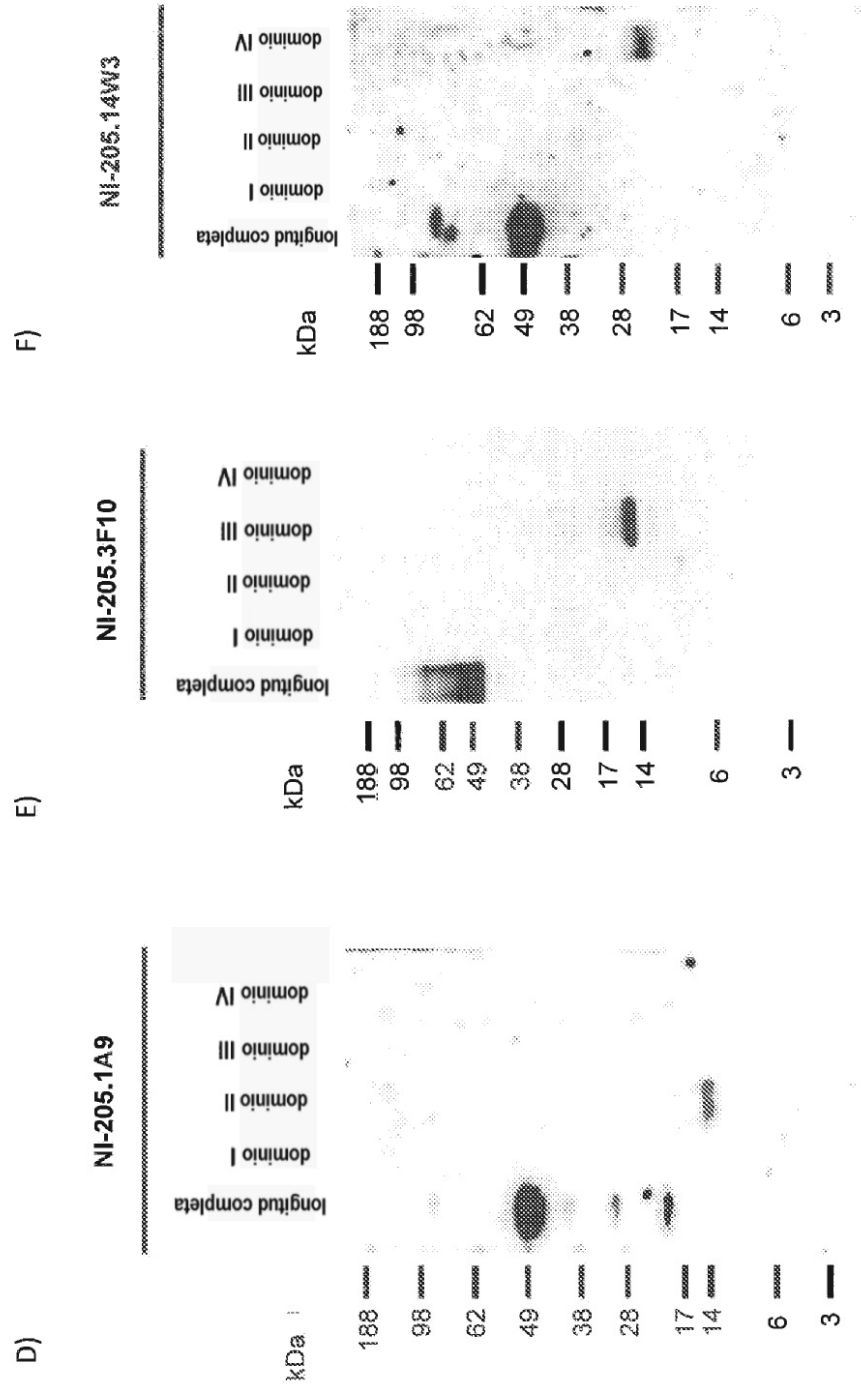


Figura 6G-I
Unión con distintos dominios de TDP-43 por inmunotransferencia

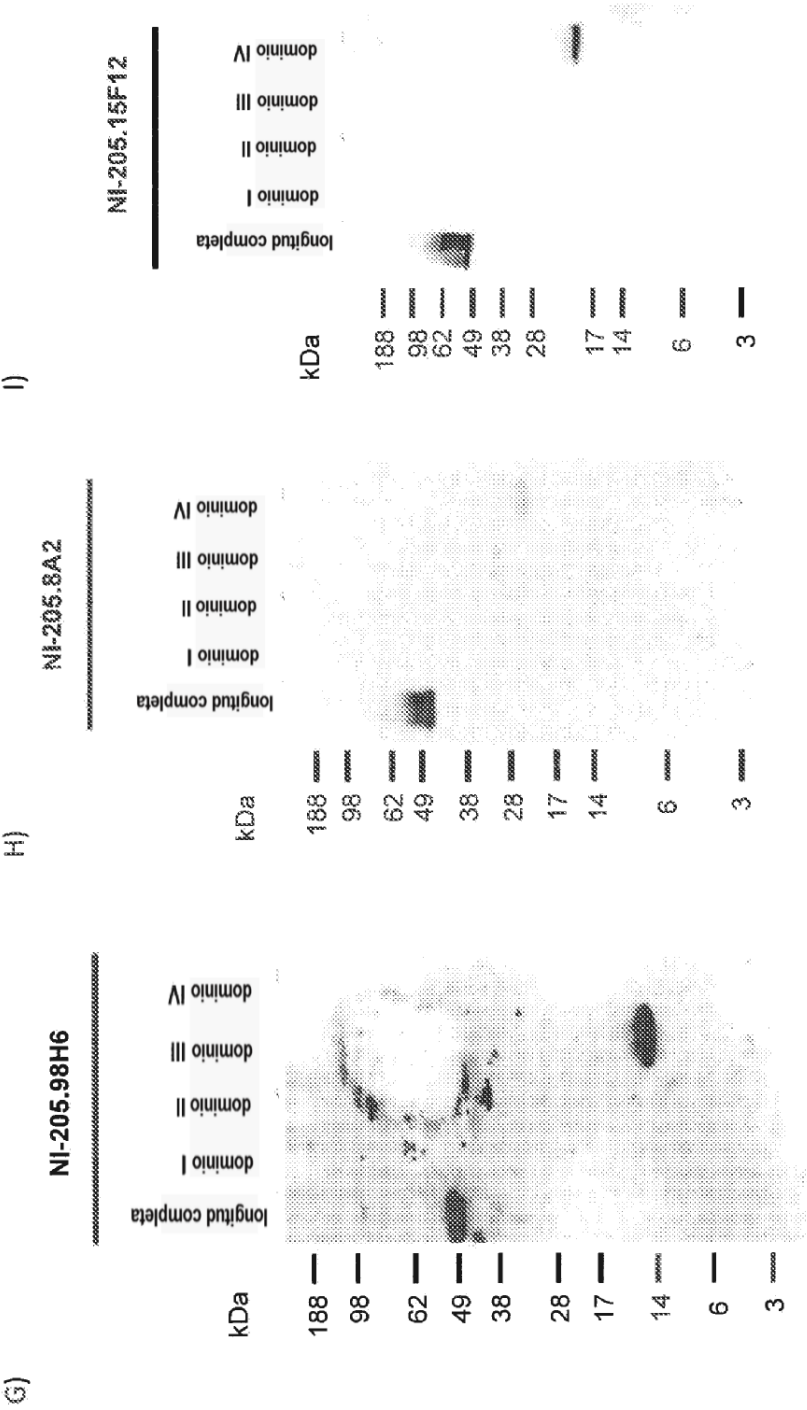


Figura 6J-L
Unión con distintos dominios de TDP-43 por inmunotransferencia

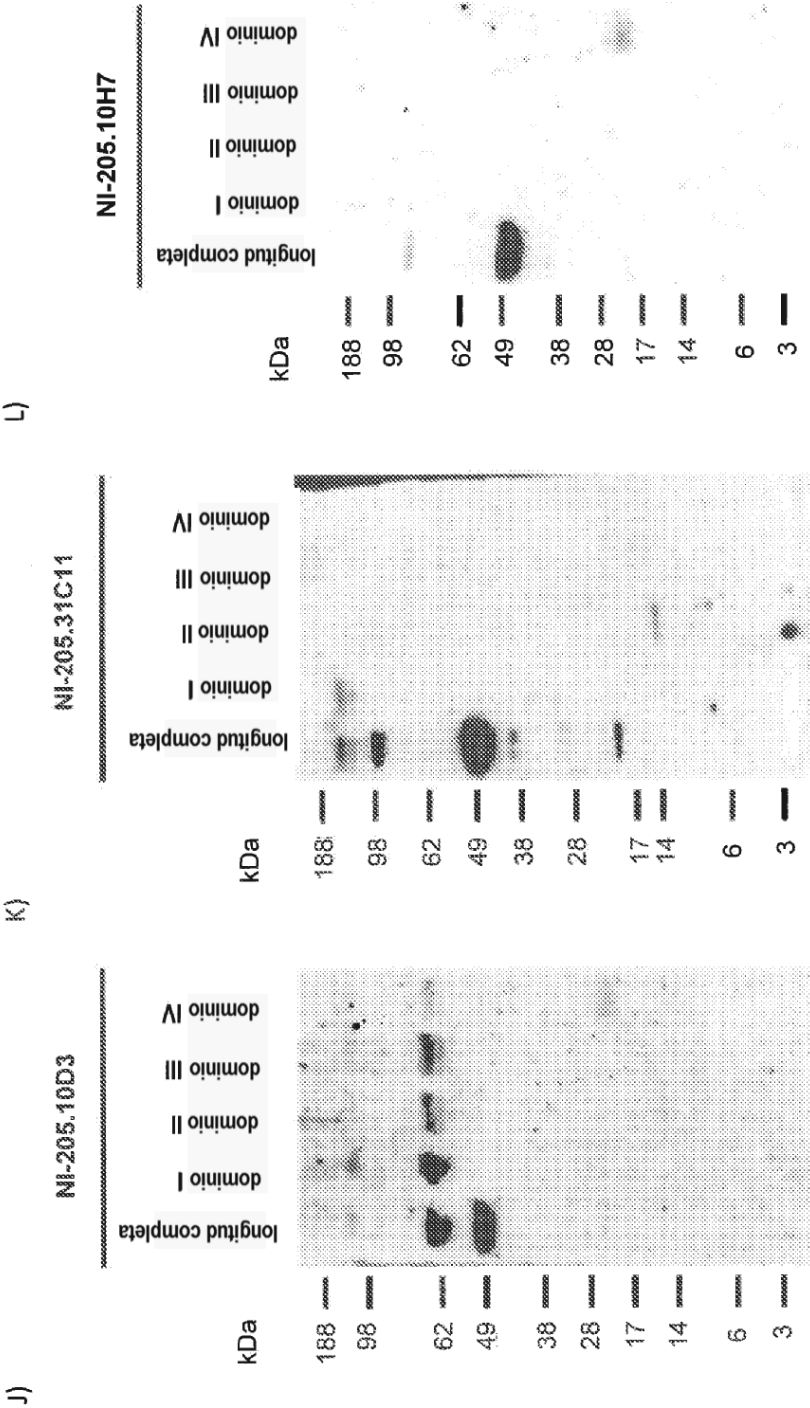


Figura 6M-O
Unión con distintos dominios de TDP-43 por inmunotransferencia

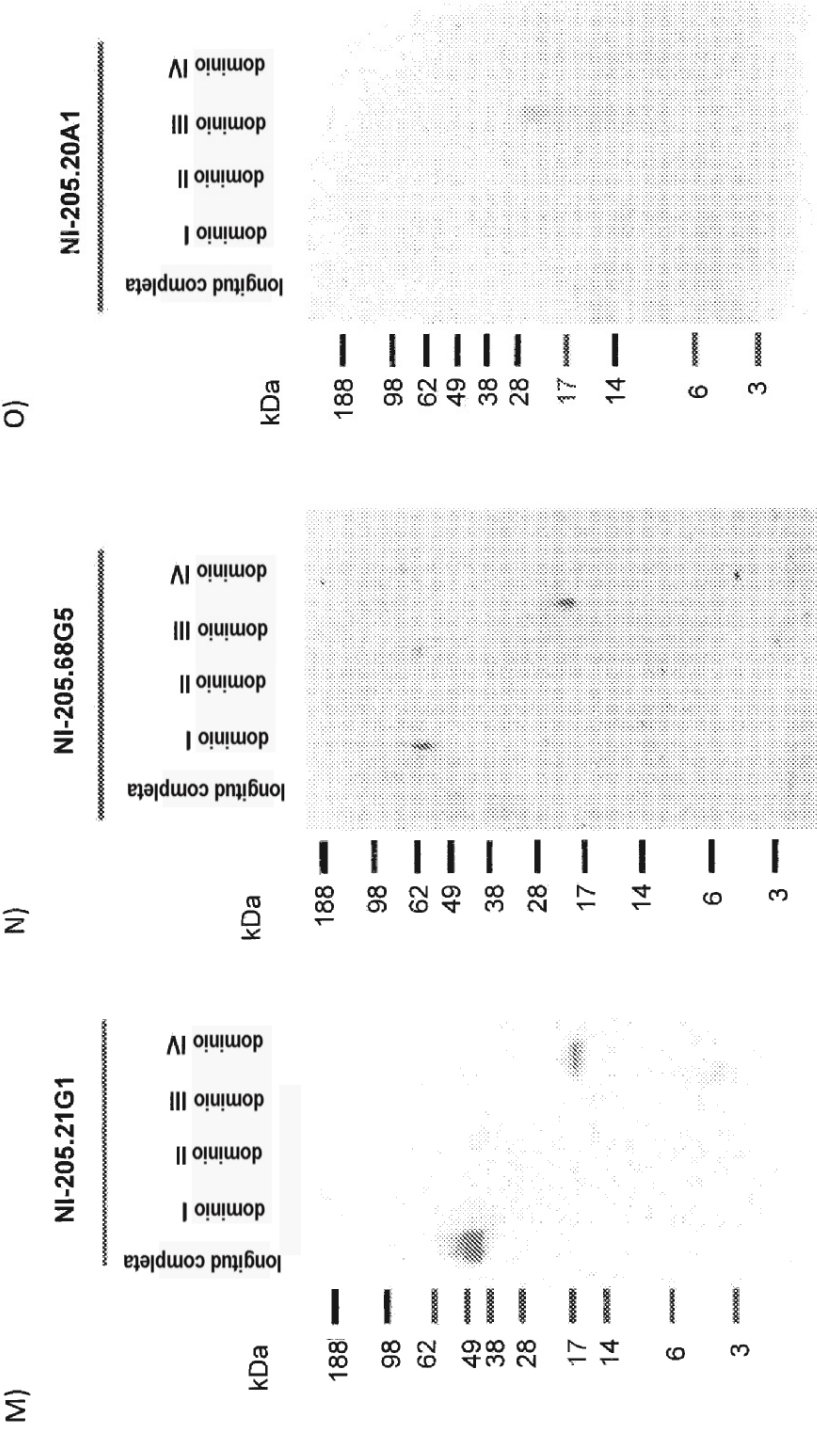


Figura 6P-Q
Unión con distintos dominios de TDP-43 por inmunotransferencia

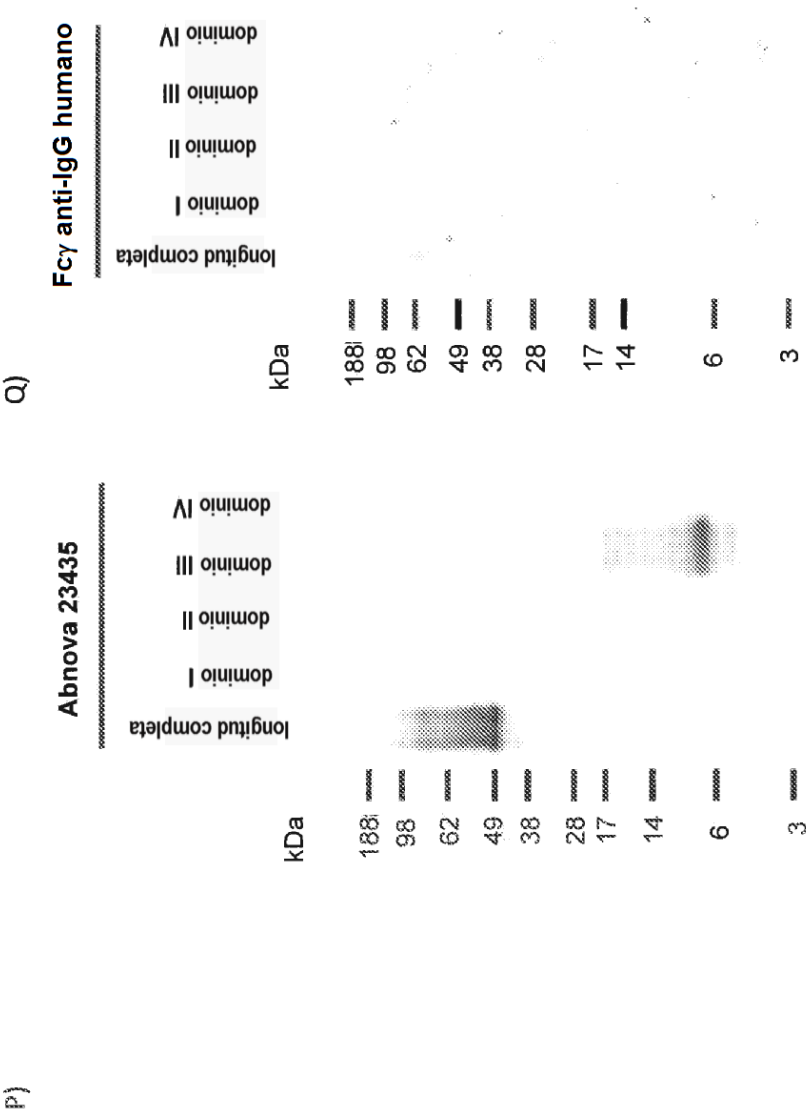
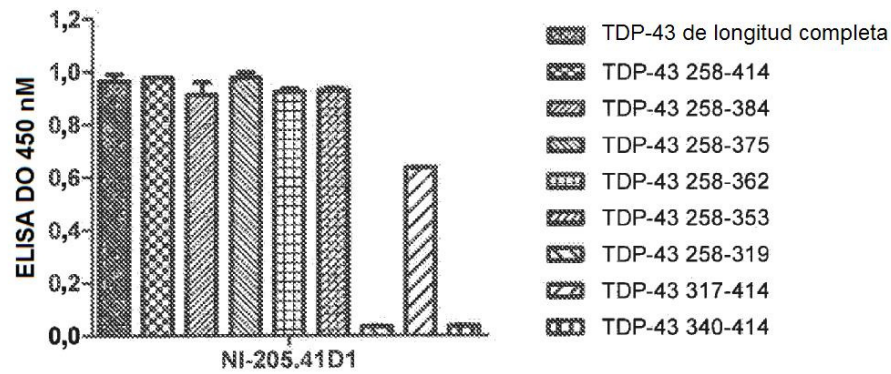


Figura 7A B**Determinación de epítipo de unión de NI-205.41D1**

A)



B)

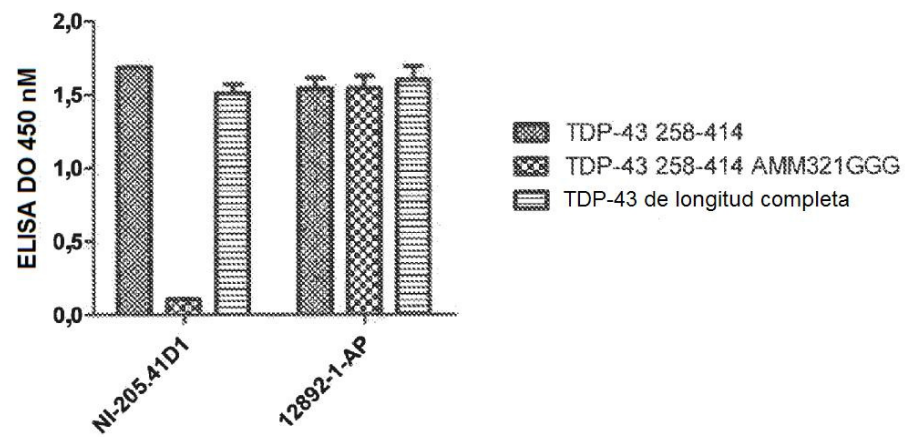


Figura 7C**Determinación de epítipo de unión de NI-205.41D1**

C)

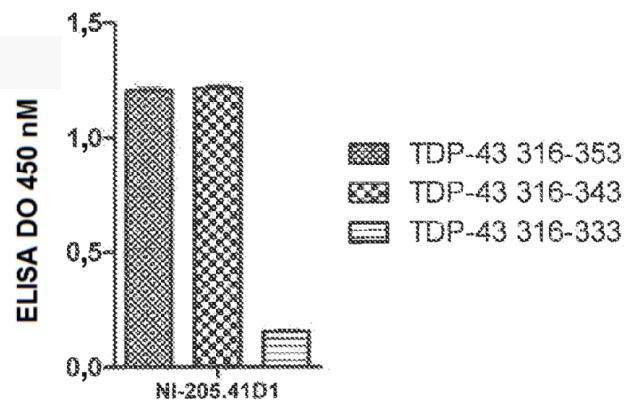


Figura 8A B

Purificación de formas monoméricas de TDP-43 usando condiciones caotrópicas suaves

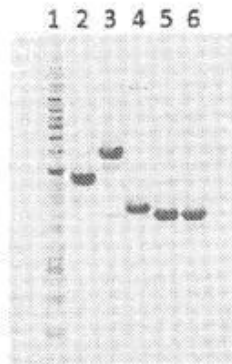
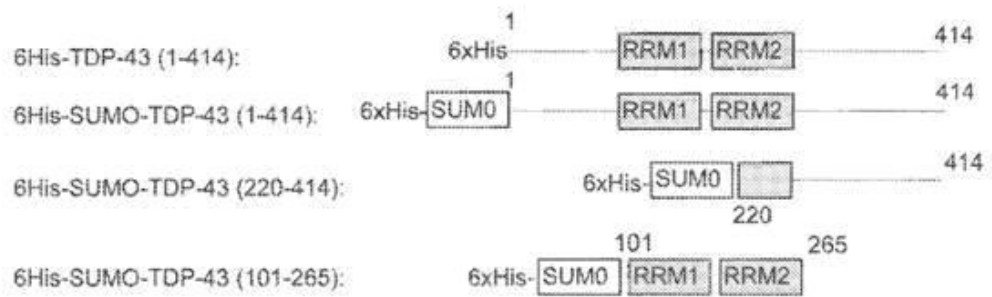
A**B**

Figura 8C

Purificación de formas monoméricas de TDP-43 usando condiciones caotrópicas suaves

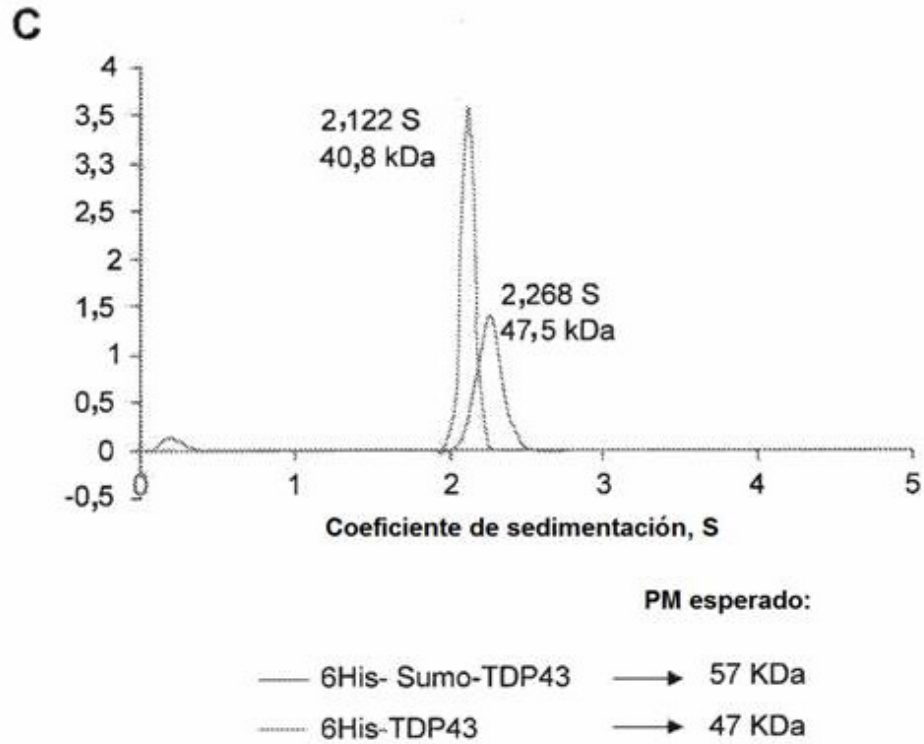


Figura 9A

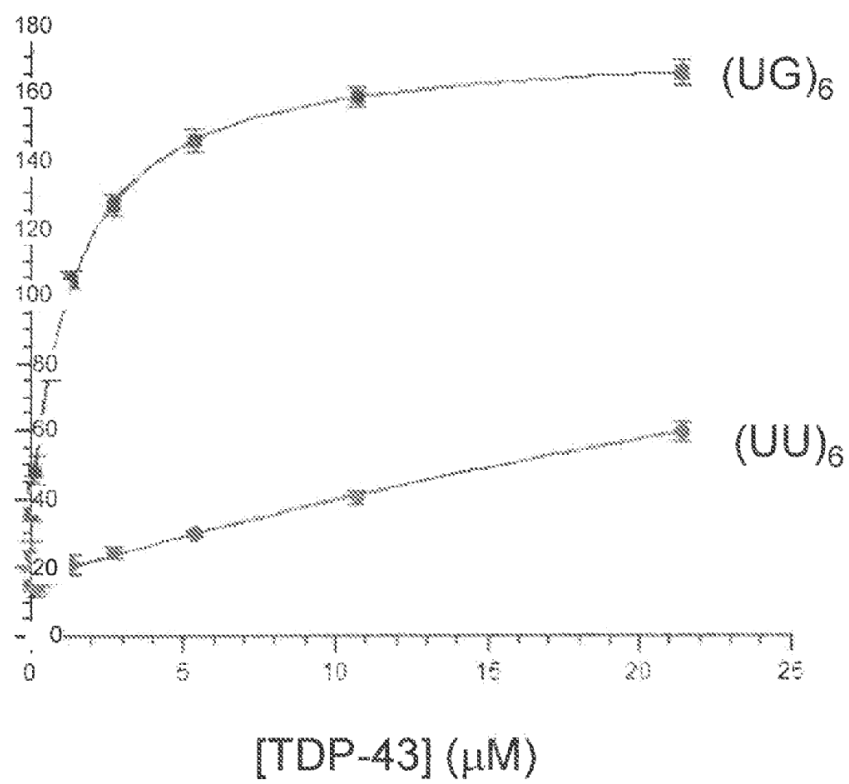


Figura 9B

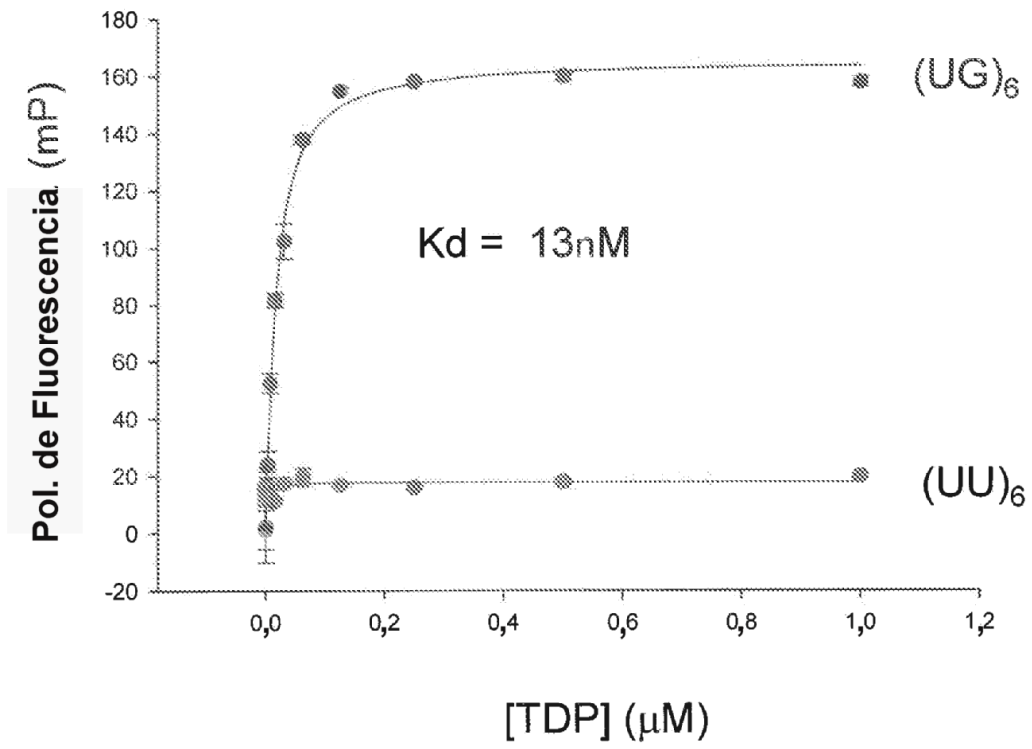


Figura 9C

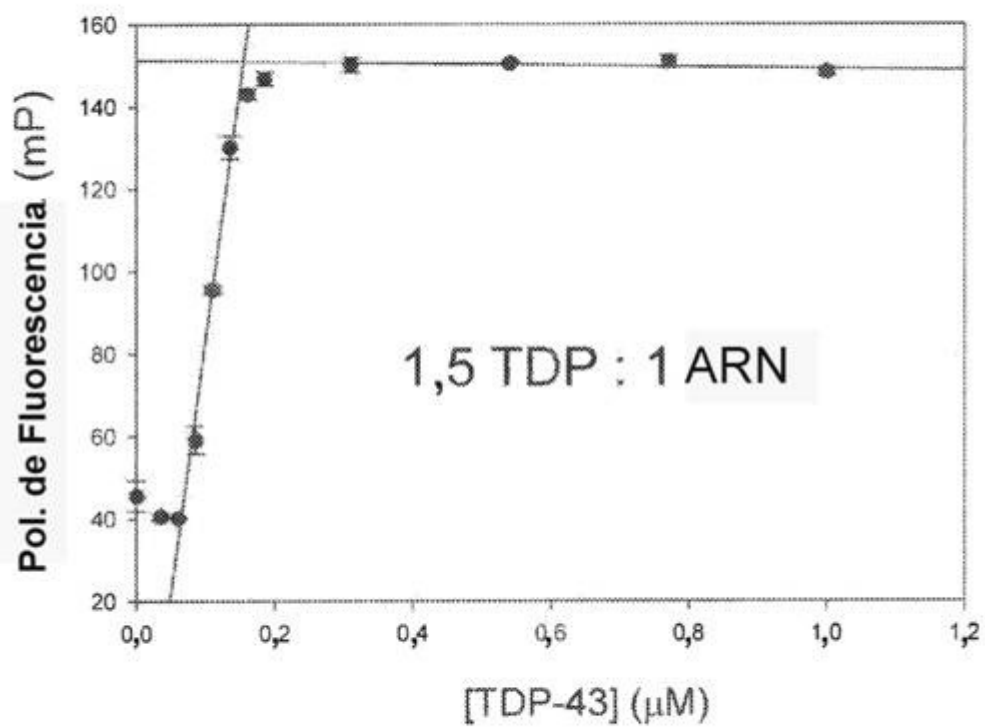


Figura 9D

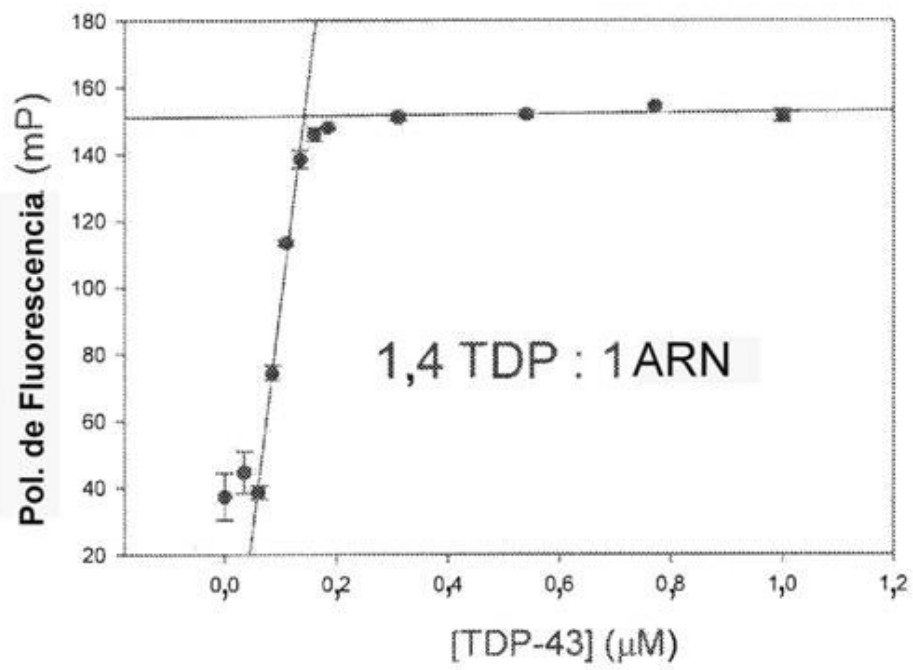


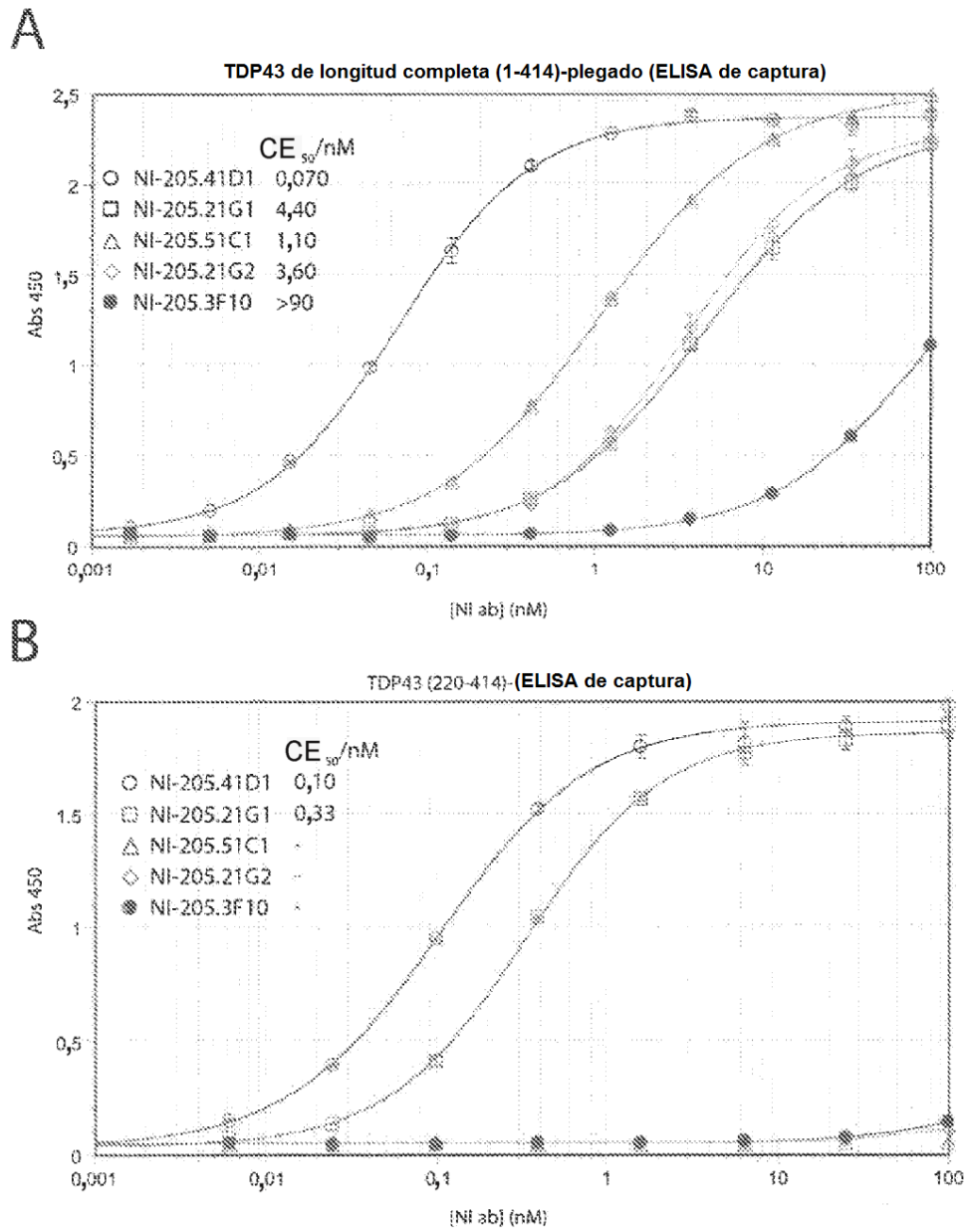
Figura 10AB

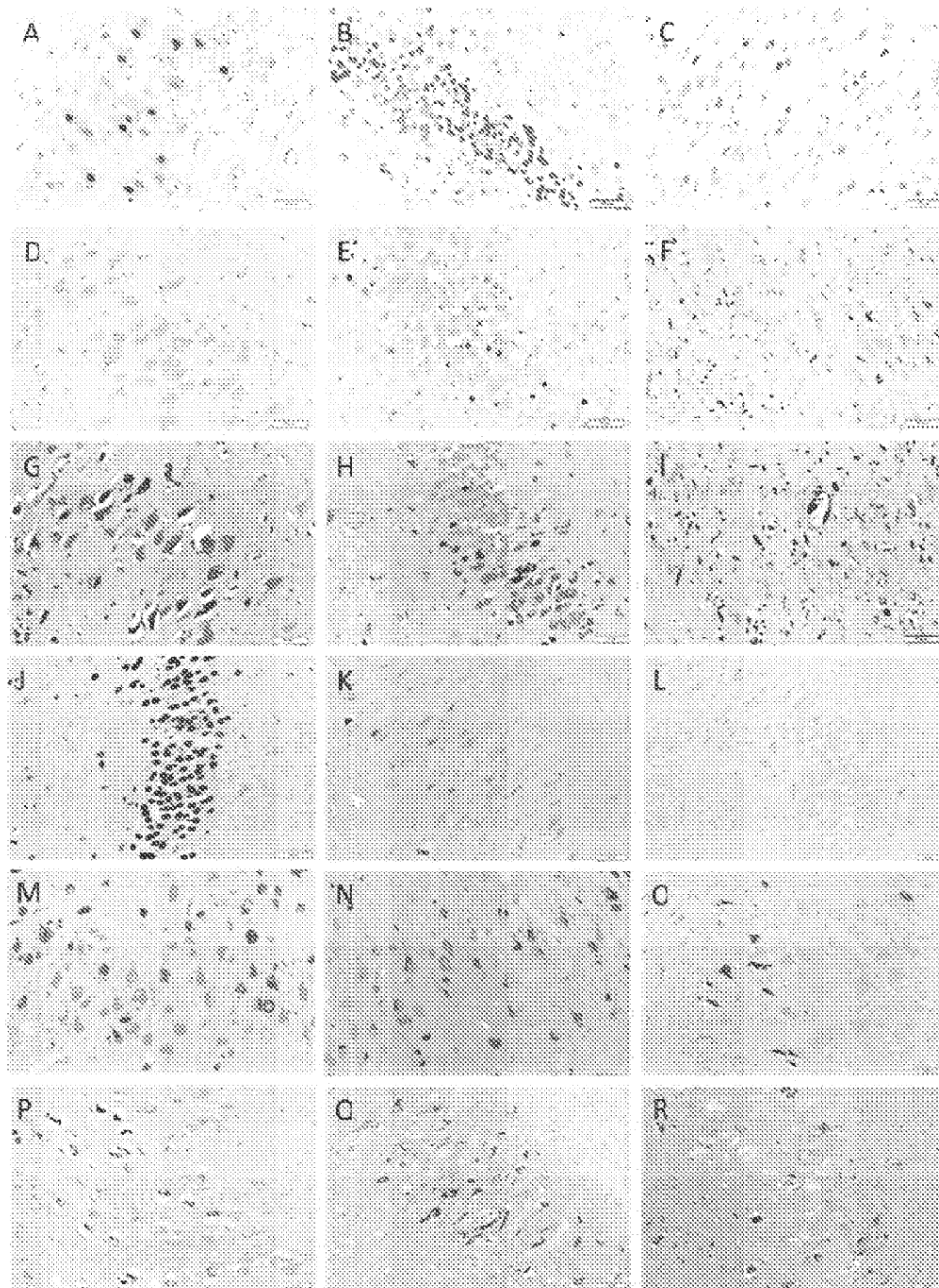
Figura 11A-R

Figura 11S-Z