ANTICUERPO ANTI-REPETICIONES DE DIPEPTIDO (DPR) DERIVADO DE HUMANO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en términos generales a terapias y métodos de diagnóstico basados en anticuerpo. En particular, la presente invención se refiere a moléculas novedosas que se unen específicamente a traducciones de tipo no ATG no convencionales, en particular repeticiones de hexanucleótido que forman repeticiones de dipéptido (DPR) y antígenos que comprenden dichas DPR, las cuales son útiles en el diagnóstico de enfermedades y condiciones inducidas por DPR agregadas y proteínas que contienen DPR, respectivamente. En una modalidad, la presente invención provee anticuerpos derivados de humano así como fragmentos, derivados y variantes biotecnológicas de los mismos que reconocen las DPR como se encuentran en el marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 (C9ORF72) tal como las repeticiones de poli-glicina-alanina, repeticiones de poli-glicina-prolina, repeticiones de poli-glicina-arginina, repeticiones de poli-prolina-alanina o repeticiones de poli-prolina-arginina, y las cuales son útiles en el tratamiento y diagnóstico de

enfermedades y condiciones inducidas por C9ORF72-DPR agregadas. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden dichas moléculas de unión, anticuerpos e imitadores de los mismos valiosos tanto como una herramienta de diagnóstico para identificar enfermedades asociadas con las DPR o sus agregados y también como una estrategia de vacunación pasiva para tratar dichas enfermedades, por ejemplo degeneración frontotemporal lobular (FTLD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), FTLD-ALS, y ataxia espinocerebelar tipo 36

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La degeneración fronto temporal lobular (FTLD por sus siglas en inglés) pertenece a un grupo de trastornos clínica, patológica y genéticamente heterogéneos asociados con atrofia en el lóbulo frontal y en lóbulo temporal del cerebro. Es la segunda causa más común de demencia de inicio temprano. Los síntomas cognitivos son variables e incluyen demencia, cambios de la conducta así como de la personalidad, disfunciones del lenguaje y/o psicosis que son debidas a la degeneración de la corteza frontal y temporal. Debido a sus síntomas, FTLD se puede dividir en tres grupos (i) demencia frontotemporal

variante conductual (bvFTLD), (ii) demencia semántica (SD por sus siglas en inglés) o (iii) afasia no afluente progresiva (PNFA por sus siglas en inglés). Los pacientes con FTLD mueren 5-10 años después del inicio de los síntomas, debido a que no se dispone de una terapia apropiada. Sin embargo, se demostró que el 50% de los pacientes con FTLD tienen un historial familiar positivo y comparado con esclerosis lateral amiotrófica (ALS) parece representar un continuum patológico con una patogénesis subyacente compartida. Aunque se demostró que ambos trastornos autosómicos dominantes son genéticamente y patológicamente heterogéneos, véase, por ejemplo, Vance *et al*., Brain 129 (2006), 868-876, el análisis genético identificó una repetición de hexanucleótido expandida heterocigota (GGGGCC) localizada entre los exones no codificadores 1a y 1b del gen de C9ORF72 como la causa genética más común de FTLD y ALS; véase, por ejemplo, DeJesus-Hernandez *et al*., Neuron 72 (2011), 245-256 y Renton *et al*., Neuron 72 (2011), 257-268. En particular, se demostró que la traducción tipo no ATG no convencional del transcrito sentido en los tres marcos de lectura alternativos, es decir, de las repeticiones de hexanucleótido expandidas, dan como resultado la producción, generación y agregación de tres polipéptidos diferentes, cada uno constituido por unidades repetitivas de dos aminoácidos

(repeticiones de dipéptido, DPR), es decir, poli-(Gly-Ala; GA), poli-(Gly-Pro; GP) y poli-(Gly-Arg; GR). Asimismo, la traducción de los transcritos antisentido correspondientes da como resultado la generación de poli-(Pro-Arg; PR), poli-(Pro-Ala; PA), y poli-(Gly-Pro; GP). Estas expansiones de C9ORF72-repetición de dipéptido (DPR) demostraron explicar hasta 30% de pacientes con FTLD, 50% de pacientes con ALS y 80% de pacientes con FTLD-ALS con las frecuencias de mutación más altas observadas en las poblaciones caucásicas de los Estados Unidos de Norteamérica y de la Unión Europea. De manera adicional, los pacientes con la expansión C9ORF72-DPR con más de 19 repeticiones tienen una edad de inicio más baja, incidencia incrementada de trastornos neurológicos, y propensión hacia psicosis o alucinaciones en comparación con pacientes con otras formas de FTLD y/o ALS; véase, por ejemplo, Harms *et al*., Neurobiol. Aging 34 (2013), e13-e19.

Sin embargo, también se han reportado otras enfermedades y/o trastornos los cuales parecen estar asociados con expansiones de una repetición de hexanucleótido, por ejemplo, ataxia espinocerebelar tipo 36. En efecto, dichas repeticiones en tándem (ya sea como microsatélites o minisatélites) son ADN propenso a mutación en organismos tanto eucariotas como procariotas. Por ejemplo, las adhesinas

de superficie celular de las bacterias con frecuencia contienen las repeticiones de SD de minisatélite, que codifican para el par de aminoácido de serina-aspartato con un arreglo de repeticiones de 18 nucleótidos, cuyos elementos siguen el consenso GAYTCNGAYTCNGAYAGY, en el cual N es cualquier base y Y es T o C, especialmente en cepas estafilocócicas. Se ha descubierto que las repeticiones de serina-aspartato (SDR) están presentes en una región repetitiva variable de estas adhesinas, tal como el dominio R del factor de aglutinación ClfA); véase, por ejemplo, Hazenbos *et al*., PLOS Pathogens 9 (2013), e1003653.

Faltan tratamientos para enfermedades y/o trastornos asociados con una expansión de repetición de dipéptido (DPR), por ejemplo medicamentos que desaceleran el avance de la enfermedad. El foco principal de cuidado médico hasta ahora descansa en la provisión de productos farmacéuticos para el tratamiento de los síntomas acompañantes con frecuencia muy estresantes. Sin embargo, hasta ahora no hay evidencia de un tratamiento efectivo.

Este problema técnico es solucionado por las modalidades caracterizadas en las reivindicaciones y descritas más adelante e ilustradas en los Ejemplos y Figuras.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención provee anticuerpos monoclonales derivados de humano capaces de ligar repeticiones de dipéptido (DPR) y proteínas que contienen DPR (proteínas de DPR) así como moléculas de unión a proteína de DPR equivalentes tales como los fragmentos de unión a DPR, variantes sintéticas y derivados biotecnológicos de los anticuerpos ejemplificados en la presente solicitud las cuales son particularmente útiles en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades y condiciones asociadas con proteínas de DPR y formas agregadas de las mismas. De manera más específica, se proveen anticuerpos derivados de humano y moléculas de unión a proteína de DPR equivalentes terapéuticamente útiles que reconocen las DPR que consisten de las repeticiones de poli-glicina-alanina (Gly-Ala; GA), poli-glicina-prolina (Gly-Pro; GP), poli-glicina-arginina (Gly-Arg; GR), poli-prolina-arginina (Pro-Arg; PR), o poli-prolina-alanina (Pro-Ala; PA), y proteínas que comprenden dichas DPR.

Los experimentos realizados de conformidad con la presente invención son exitosos en el aislamiento de anticuerpos anti-DPR específicos monoclonales derivados de humano los cuales maduran en el cuerpo humano y son capaces

de reconocer específicamente las especies de proteína C9ORF2-DPR no agregadas y agregadas y fragmentos de las mismas. Los individuos humanos que son la fuente de células B a partir de las cuales se han aislado los anticuerpos anti-proteína de DPR monoclonales derivados de humano y el ADNc que codifica para sus dominios variables, respectivamente, están libres de síntomas de condiciones neurológicas y neurodegenerativas. Sin embargo, en otra modalidad de la presente invención, la fuente de células B a partir de las cuales se podrían aislar los anticuerpos anti-DPR monoclonales derivados de humano y el ADNc que codifica para sus dominios variables, respectivamente, son pacientes que muestran síntomas de una enfermedad y/o trastorno asociado con las proteínas de DPR. Debido a que los anticuerpos de la presente invención se aíslan a partir del cuerpo humano y como se demuestra en los Ejemplos, se demuestra que se unen específicamente a proteínas de DPR en pacientes con FTLD, es prudente esperar que los anticuerpos anti-proteína de DPR monoclonales de humano de la presente invención y los derivados de los mismos además de ser no inmunogénicos también exhiban un efecto terapéuticamente benéfico en el humano.

La demencia frontotemporal (FTD), también conocida como enfermedad de Pick, es un grupo de trastornos asociados con la

degeneración progresiva de célula nerviosa en los lóbulos frontal y/o temporal del cerebro. Los síntomas asociados con la función reducida del cerebro debido a daño celular y el encogimiento de tejido se denominan como degeneración frontotemporal lobular (FTLD). Como ya se explicó anteriormente en la sección de antecedentes cuyo contenido de divulgación queda incorporada en la presente solicitud, se identificó una repetición de hexanucleótido expandida heterocigota (GGGGCC), es decir repetición de dipéptido (DPR), localizada entre los exones no codificadores 1a y 1b del C9ORF72 (NC_000009.12, 27546545-27573866, complemento; NG_031977.1, RefSeqGene 5001-32322) como la causa más común de FTLD y esclerosis lateral amiotrófica (ALS). La repetición de hexanucleótido expandida da como resultado la producción, generación y/o agregación de diferentes polipéptidos que consisten de unidades repetitivas de dos aminoácidos (repeticiones de dipéptido, DPR), en particular poli-(Gly-Ala; GA), poli-(Gly-Pro; GP), poli-(Pro-Arg; PR), o poli-(Pro-Ala, PA), y/o poli-(Gly-Arg; GR).

La presente invención está dirigida en términos generales a anticuerpos derivados de humano, fragmentos de unión a antígeno, variantes sintéticas y biotecnológicas de los mismos y moléculas de unión a antígeno equivalentes los cuales son

capaces de reconocer específicamente las proteínas de DPR, en particular aquellas en las cuales la DPR consiste de poli-(Gly-Ala; GA), poli-(Gly-Pro; GP), poli-(Pro-Arg; PR), poli-(Pro-Ala, PA), y/o poli-(Gly-Arg; GR). Por lo tanto, la presente invención se refiere tanto a anticuerpos que reconocen selectivamente una repetición de dipéptido particular, por ejemplo poli-GA así como anticuerpos que son capaces de reconocer más de una repetición de dipéptido, por ejemplo poli-GA y poli-GP o poli-GR, poli-GA y poli-PR ya sea sustancialmente con la misma afinidad o con afinidad diferente pero todavía significativamente sobre el fondo. Si no se indica de otra manera, con anticuerpos que "reconocen específicamente DPR", "anticuerpo específico para DPR" y "anticuerpo anti-DPR" se quiere decir que específicamente, generalmente, y colectivamente se unen a la forma nativa o agregada de "proteínas de DPR", "repeticiones de dipéptido", "DPR" los cuales se utilizan de manera intercambiable en la presente solicitud. Las DPR son los resultados de una repetición de hexanucleótido expandida y comprenden unidades repetitivas de dos aminoácidos. Las unidades repetitivas pueden comprender cualquier aminoácido. Sin embargo, en una modalidad preferida de la presente invención la DPR comprende glicina y alanina (Gly-Ala; GA), glicina y prolina (Gly-Pro; GP), glicina y arginina (Gly-Arg; GR),

prolina y arginina (Pro-Arg; PR), o prolina y alanina (Pro-Ala, PA). Por lo tanto, en la presente solicitud se proveen anticuerpos derivados de humano, fragmentos de unión a proteína, variantes sintéticas y biotecnológicas de los mismos selectivos para proteínas de DPR que consisten de GA, GP, GR, PR, o PA. En una modalidad preferida las moléculas de unión a DPR de la presente invención se unen a proteínas de DPR que contienen números más altos de repeticiones, es decir, DPR que consisten de $(GA)_X$, $(GP)_X$, $(GR)_X$, $(PR)_X$, o $(PA)_X$. De manera particular, la X representa el número de repeticiones, por ejemplo, una proteína de DPR con 15 repeticiones será indicada como $(GA)_{15}$, significando también que, por ejemplo, la expansión de hexanucleótido G_4C_2 está repetida 15 veces. En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo de preferencia reconoce una proteína de DPR de $(GA)_{15}$.

Típicamente, la capacidad de un anticuerpo para ligar una proteína de DPR se evalúa utilizando un péptido de DPR unido a una proteína portadora tal como BSA o GST; véase, por ejemplo, Mori *et al.*, Science 339 (2013), 1335-1338 y Mackenzie *et al.*, Acta Neuropathol. 126 (2013), 859-879 que describen entre otras cosas el uso de proteína GST-GA_{15} recombinante en la generación y caracterización de anticuerpo anti-GA monoclonal de ratón. Sin embargo, los experimentos

realizados de conformidad con la presente invención revelan de manera sorpresiva que algunos anticuerpos anti-DPR que carecen de unión significativa a péptidos de DPR copulados con BSA o que despliegan solamente una afinidad bastante baja se unen al péptido de DPR no copulado y con una afinidad sustancialmente más alta que la del péptido de DPR copulado con BSA. Comparar, por ejemplo, los valores de CE_{50} presentados en forma resumida en la figura 3A para el anticuerpo anti-poli GA NI-308.45C2, anticuerpo anti-poli PR NI-308.24E11 y en particular de los anticuerpos anti-poli GR NI-308.6B11 y NI-308.46F8 los cuales no se unen al péptido $(GR)_{15}$ copulado con BSA en lo absoluto y por lo tanto muy probablemente podrían haber sido perdidos en los métodos ELISA utilizados en la técnica antecedente para la generación de anticuerpos anti DPR monoclonales de ratón.

Por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 2014/114303 A1 y WO 2014/114660 A1, respectivamente describen anticuerpos policlonales generados en conejo contra poli-GA $(GA)_{15}$ y poli-GP $(GP)_{15}$ fusionados la proteína de unión a maltosa (MBP por sus siglas en inglés) y anticuerpos monoclonales de ratón generados contra poli-GA $(GA)_{10}$ agregada ligada a polietilenglicol (PEG) y que reconocen poli-GA $(GA)_{15}$ fusionada a glutatión S-transferasa (GST). Sin

embargo no se divulgan datos en cuanto a la especificidad de unión hacia proteínas amiloidogénicas no relacionadas y unión a agregados de DPR patológicos en tejido de cerebro C9orf72-FTLD de humano. Por lo tanto la utilidad diagnóstica y terapéutica de dichos anticuerpos no ha sido sustanciada y queda por verse.

La solicitud internacional WO 2014/116865 A1 describe la generación de anticuerpos policlonales generados en conejo contra una mezcla de poli-GA $(GA)_8$, poli-GP $(GP)_8$, y poli-GR $(GR)_8$ cada una copulada al ácido aminohexanoico (Ahx) y conjugada al éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) como un portador inmune. Se describe que un anticuerpo policlonal de conejo denominado MC-001 se une a poli-GP $(GP)_8$ pero no a las otras DPR. Se describe que el anticuerpo policlonal MC-001 detecta inmunorreactividad en fluido cerebroespinal (CSF) de pacientes con ALS C9+ y las inclusiones insolubles de polipéptidos poli-GP en los cerebros de pacientes con la expansión genética de C9ORF72. Asimismo, se describen intentos para la generación de anticuerpos policlonales anti-poli-GA, anti-poli-GP, anti-poli-GR y anti-poli-PA en conejo y cabra, respectivamente, utilizando péptidos de DPR individuales con diferentes números de repetición y portadores inmunes así como un experimento para producir

anticuerpos anti-poli-GP monoclonales de ratón con la estrategia utilizada para la generación del anticuerpo policlonal MC-001. Sin embargo, aunque se describe que se han obtenido 3 clones de anticuerpo monoclonal G2, G3 y G4 los cuales ligan a poli-GP $(GP)_8$ solamente, no se describen datos en cuanto a la especificidad de unión hacia proteínas amiloidogénicas no relacionadas y la unión a agregados de DPR patológicos en tejido de cerebro C9orf72-FTLD de humano. Asimismo, además de la descripción críptica del protocolo para producir el anticuerpo monoclonal no se provee información de secuencia sobre la región variable del anticuerpo o depósito del mismo. Por lo tanto, en este caso también la utilidad diagnóstica y terapéutica de los anticuerpos monoclonales posiblemente obtenibles mediante el protocolo de inmunización enseñado en WO 2014/116865A1 sigue por ser investigada.

La solicitud internacional WO2014/159247 A1 describe anticuerpos policlonales de conejo y ratón que han sido generados contra péptidos de DPR sintéticos con diferentes números de repeticiones y modificaciones N-terminales y/o C-terminales, por ejemplo acetilación y amidación. Sin embargo, no se describe la generación de anticuerpos anti-DPR monoclonales. Asimismo, el documento WO2014/159247 A1 describe entre otras cosas un modelo en ratón transgénico de

ALS de C9ORF72 para probar la hipótesis de que ambos transcritos sentido y antisentido contribuyen a ALS/FTD. De conformidad con la presente invención, este modelo en ratón se puede utilizar para probar la utilidad terapéutica de los anticuerpos de la presente invención.

En resumen, la técnica antecedente no enseña ni sugiere, sin mencionar proveer anticuerpos anti-DPR que liguen selectivamente una o más de las DPR derivadas a partir de los diferentes marcos de lectura del gen C9orf72, que sean capaces de ligar los agregados de DPR patológicos en tejido de cerebro C9orf72-FTLD de humano y que tengan utilidad tanto en la diagnosis como en la terapia de trastornos asociados con la acumulación y agregación de proteínas de DPR tal como en ALS/FTD. En contraste, la presente invención provee por primera vez un conjunto de anticuerpos anti-DPR derivados de humano monoclonales provenientes de células B de memoria humanas, las cuales reconocen específicamente una o más DPR tal como son traducidas a partir del gen C9orf72 en su dirección sentido y/o antisentido. Como se demuestra en los Ejemplos, los anticuerpos anti-DPR derivados de humano monoclonales de la presente invención tienen afinidad elevada, no reconocen sustancialmente proteínas amiloidogénicas no relacionadas y son capaces de unirse a los agregados de DPR patológicos en

tejido de cerebro C9orf72-FTLD de humano.

Por lo tanto, y en vista del hecho de que los anticuerpos anti-DPR de la presente invención se obtienen a partir de auto-anticuerpos de humano y por lo tanto se supone que son sustancialmente no inmunogénicos en humanos es prudente esperar que además de su valor diagnóstico ilustrado en los Ejemplos éstos tengan también utilidad terapéutica. En este contexto, se debe indicar que la técnica antecedente no dice nada en cuanto a la posible existencia de auto-anticuerpos de humano contra proteínas de DPR pero enseña a aplicar la inmunización de animales de laboratorio con péptidos de DPR sintéticos y modificados solamente, y que la generación de anticuerpos anti-DPR monoclonales de ratón es bastante difícil debido a que fallan los métodos de inmunización comunes y solamente la inmunización con un péptido poli-GA $(GA)_{10}$ conjugado con PEG da como resultado clones de anticuerpo estables; véase, por ejemplo, solicitud internacional WO 2014/114660 A1 en el Ejemplo 10 en la página 80, renglones 5 a 15. Por lo tanto, esto hace que los hallazgos de la presente invención, es decir, provisión de anticuerpos anti-DPR derivados de humano sea lo más sorpresivo debido a que desde luego la células B de memoria que proveen la fuente de los anticuerpos de la presente invención se obtienen a partir de

pacientes/voluntarios humanos no inmunizados.

Por consiguiente, la presente invención se refiere en términos generales a las siguientes modalidades:

[1] Un anticuerpo monoclonal derivado de humano capaz de ligar una repetición de dipéptido (XX') (DPR), o un fragmento de unión a DPR, variante sintética o derivado biotecnológico del mismo el cual reconoce por lo menos una DPR tal como se traduce a partir del gen del marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 (C9orf72) en su dirección sentido y/o antisentido, de preferencia en el cual por lo menos una, de preferencia dos y de manera más preferida todas las tres CDR de una o de preferencia de tanto la cadena ligera variable como la cadena pesada variable del anticuerpo se obtienen a partir de un anticuerpo de humano tal como son expresadas por una célula B de memoria de humano (autoanticuerpo de humano). De preferencia, el anticuerpo reconoce por lo menos dos DPR diferentes, de preferencia por lo menos una DPR tal como se traduce a partir del gen de C9orf72 en su dirección sentido y por lo menos una DPR tal como se traduce a partir del gen de C9orf72 en su dirección antisentido; véase, por ejemplo, el presente anticuerpo NI-308.6B11 ilustrado en los Ejemplos y en la tabla en la figura 2A. En aras de la claridad se debe entender que a menos que se indique de otra manera la referencia al

anticuerpo en los siguientes ítems sólo se hace por ratones de concisión y desde luego incluye el fragmento de unión a DPR, variante sintética y derivado biotecnológico del anticuerpo, mencionados.

[2] El anticuerpo de [1], en el cual la DPR está contenida en o está conjugada a una proteína (DPR-proteína), de preferencia en la cual la proteína es seroalbúmina de bovino (BSA) y está conjugada a la DPR.

[3] El anticuerpo de [1] o [2], en el cual la DPR consiste de las repeticiones poli-glicina-alanina (Gly-Ala; GA), poli-glicina-prolina (Gly-Pro; GP), poli-(Gly-Arg; GR), poli-(Pro-Arg; PR), y/o poli-(Pro-Ala, PA), de preferencia en el cual el número de repeticiones es $(XX')_{15}$.

[4] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [3], el cual reconoce una combinación de proteínas de DPR, de preferencia en el cual las proteínas de DPR consisten de poli-(GA) o poli-(PA), poli-(GP) o poli-(PA), o poli-(GR) o poli-(PR), de preferencia en el cual el anticuerpo reconoce poli-(GA) y poli-(GP); poli-(GA) y poli-(GR); poli-(PA) y poli-(GA); poli-(GA), poli-(GR) y opcionalmente poli-(PR); poli-(PA), poli-(PR) y opcionalmente poli-(GR); o poli-(PA), poli-(GR), poli-(PR) y opcionalmente poli-(GA).

[5] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [4], en el cual el

anticuerpo es capaz de unirse a un péptido de DPR que consiste de $(XX')_{15}$, opcionalmente en el cual el anticuerpo no se une o por lo menos una magnitud menor al péptido acoplado a BSA o a otra proteína portadora tal como proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), o glutatión-S transferasa (GST).

[6] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [5], el cual es capaz de unirse a las formas agregadas de la DPR y proteína de DPR, respectivamente.

[7] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [6], en el cual la DPR-proteína es C9ORF72-DPR.

[8] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [7] que reconoce una DPR que comprende una repetición GA, que comprende en su región variable

(a) por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácido de la región variable de V_H y/o V_L de cualquiera de los anticuerpos NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1, y NI-308.45C2 mostrada en cualquiera de las figuras 1A-1D, y representada en

(i) secuencia de V_H (SEQ ID NOs: 2, 8, 22, 26, 30, 34); y

(ii) secuencia de V_L (SEQ ID NOs: 4, 6, 10, 12, 24, 28, 32, 36), respectivamente;

(b) una secuencia de aminoácido de la región V_H y/o V_L como se representa en cualquiera de las figuras 1A a 1D;

(c) por lo menos una CDR que consiste de una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de cualquiera de las secuencias de aminoácido de (a);

(d) una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de la secuencia de aminoácido de (b); y/o

(e) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que opcionalmente comprende también una secuencia de polipéptido la cual es heteróloga para la región V_H y/o V_L o dicha por lo menos una CDR, de preferencia en la cual la secuencia de polipéptido comprende un dominio constante de humano, de preferencia del tipo IgG, de manera más preferida de la clase o isotipo IgG1.

[9] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [7] que reconoce una DPR que comprende una repetición GP que comprende en su región variable

(a) por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácido de la región variable de V_H y/o V_L de cualquiera de los anticuerpos NI-308.5G2, NI-308.46E9 y NI.308-12A3 mostradas en la figuras

1F, 1G y 1K y representadas en

(i) secuencia de V_H (SEQ ID NOs: 14, 18, 44, 48, 72, 76); y

(ii) secuencia de V_L (SEQ ID NOs: 16, 20, 46, 50, 74, 78), respectivamente;

(b) una secuencia de aminoácido de la región V_H y/o V_L como se representa en la figura 1F, 1G o 1K;

(c) por lo menos una CDR que consiste de una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de cualquiera de las secuencias de aminoácido de (a);

(d) una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de la secuencia de aminoácido de (b); y/o

(e) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que opcionalmente comprende también una secuencia de polipéptido la cual es heteróloga para la región V_H y/o V_L o dicha por lo menos una CDR, de preferencia en la cual la secuencia de polipéptido comprende un dominio constante de humano, de preferencia del tipo IgG, de manera más preferida de la clase o isotipo IgG1.

[10] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [7] que reconoce una DPR que comprende una repetición GR que comprende en

su región variable

(a) por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácido de la región variable de V_H y/o V_L del anticuerpo NI-308.6B11 o NI-308.46F8 mostradas en las figuras 1H y 1I y representada en

(i) secuencia de V_H (SEQ ID NOs: 52, 56, 58, 62); y

(ii) secuencia de V_L (SEQ ID NOs: 54, 60), respectivamente;

(b) una secuencia de aminoácido de la región V_H y/o V_L como se representa en las figuras 1H o 1I;

(c) por lo menos una CDR que consiste de una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de cualquiera de las secuencias de aminoácido de (a);

(d) una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de la secuencia de aminoácido de (b); y/o

(e) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que opcionalmente comprende también una secuencia de polipéptido la cual es heteróloga para la región V_H y/o V_L o dicha por lo menos una CDR, de preferencia en la cual la secuencia de polipéptido comprende un dominio constante de humano, de preferencia del tipo IgG, de manera más preferida

de la clase o isotipo IgG1.

[11] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [7] que reconoce una DPR que comprende una repetición PR que comprende en su región variable

(a) por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácido de la región variable de V_H y/o V_L del anticuerpo NI-308.24E11 mostradas en la figura 1E y representada en

(i) secuencia de V_H (SEQ ID NOs: 38); y

(ii) secuencia de V_L (SEQ ID NOs: 40, 42), respectivamente;

(b) una secuencia de aminoácido de la región V_H y/o V_L como se representa en la figura 1E;

(c) por lo menos una CDR que consiste de una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de cualquiera de las secuencias de aminoácido de (a);

(d) una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de la secuencia de aminoácido de (b); y/o

(e) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que opcionalmente comprende también una secuencia de polipéptido la cual es heteróloga para la región V_H y/o V_L o

dicha por lo menos una CDR, de preferencia en la cual la secuencia de polipéptido comprende un dominio constante de humano, de preferencia del tipo IgG, de manera más preferida de la clase o isotipo IgG1.

[12] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [7] que reconoce una DPR que comprende una repetición PA que comprende en su región variable

(a) por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácido de la región variable de V_H y/o V_L del anticuerpo NI-308.4M1 mostradas en la figura 1J y representada en

(i) secuencia de V_H (SEQ ID NOs: 64, 68); y

(ii) secuencia de V_L (SEQ ID NOs: 66, 70), respectivamente;

(b) una secuencia de aminoácido de la región V_H y/o V_L como se representa en la figura 1J;

(c) por lo menos una CDR que consiste de una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de cualquiera de las secuencias de aminoácido de (a);

(d) una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de la secuencia de aminoácido de (b); y/o

(e) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que opcionalmente comprende también una secuencia de polipéptido la cual es heteróloga para la región V_H y/o V_L o dicha por lo menos una CDR, de preferencia en la cual la secuencia de polipéptido comprende un dominio constante de humano, de preferencia del tipo IgG, de manera más preferida de la clase o isotipo IgG1.

[13] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [7] que reconoce una DPR que comprende una repetición PR que comprende en su región variable

(a) por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácido de la región variable de V_H y/o V_L del anticuerpo NI-308.16C10 mostradas en la figura 1L y representada en

(i) secuencia de V_H (SEQ ID NOs: 80, 84); y

(ii) secuencia de V_L (SEQ ID NOs: 82, 86), respectivamente;

(b) una secuencia de aminoácido de la región V_H y/o V_L como se representa en la figura 1L;

(c) por lo menos una CDR que consiste de una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de cualquiera de las secuencias de aminoácido de (a);

(d) una región variable de la cadena pesada y/o una región

variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de la secuencia de aminoácido de (b); y/o

(e) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que opcionalmente comprende también una secuencia de polipéptido la cual es heteróloga para la región V_H y/o V_L o dicha por lo menos una CDR, de preferencia en la cual la secuencia de polipéptido comprende un dominio constante de humano, de preferencia del tipo IgG, de manera más preferida de la clase o isotipo IgG1.

[14] El anticuerpo de [9], el cual también es capaz de unirse a una repetición de poli-GA, de preferencia en el cual el anticuerpo es o se deriva a partir del anticuerpo NI-308.5G2.

[15] El anticuerpo de [10], el cual también es capaz de unirse a una repetición de poli-GA, de preferencia en el cual el anticuerpo es o se deriva a partir del anticuerpo NI-308.6B11.

[16] El anticuerpo de [10] o [14], el cual también es capaz de unirse a una repetición de poli-PR, de preferencia en el cual el anticuerpo es o se deriva a partir del anticuerpo NI-308.6B11.

[17] El anticuerpo de [12], el cual también es capaz de unirse a una repetición de poli-GA, de preferencia en el cual el anticuerpo es o se deriva a partir del anticuerpo NI-308.4M1.

[18] El anticuerpo de [13], el cual también es capaz de

unirse a una repetición de poli-GA, de preferencia en el cual el anticuerpo es o se deriva a partir del anticuerpo NI-308.16C10.

[19] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [18], el cual selectivamente o de manera preferencial se une al péptido de DPR no copulado.

[20] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [19], el cual se une a la DPR solamente si el número de repeticiones n es ≥ 6, de preferencia ≥ 10, de manera más preferida ≥ 15.

[21] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [20], el cual es capaz de unirse a DPR no copulada y copulada con BSA con afinidad sustancialmente igual o dentro del mismo orden de magnitud, de preferencia en el cual el valor de CE_{50} (mitad de la concentración efectiva máxima) para unirse a la DPR no copulada y la DPR copulada a BSA difiere en no más de un factor de ≤20, de preferencia ≤ 15, de manera más preferida ≤ 10, de manera incluso más preferida ≤ 5, y más preferido aún no más de aproximadamente ≤ 2 o 3 según se determina mediante ELISA indirecta, en el cual el número de repetición n es 15.

[22] El anticuerpo anti-DPR de cualquiera de [1] a [22], el cual es capaz de unirse a dos o más DPR diferentes con afinidad sustancialmente igual o dentro del mismo orden de magnitud, de preferencia en el cual el valor de CE_{50} para unión a cualquiera de las DPR es por lo menos ≤ 200 nM, de

preferencia ≤ 150 nM, de manera más preferida ≤ 100 nM, de manera incluso más preferida ≤ 50 nM y más preferido aún ≤ 25 nM para unirse a DPRn o proteína de DPRn según se determina mediante ELISA indirecta, en el cual el número de repetición n es 15. Por ejemplo, el anticuerpo NI-308.5G2 se une a $(GA)_{15}$ con CE_{50} de aproximadamente 15.3 y a $(GP)_{15}$ con una CE_{50} de aproximadamente 0.88, y el anticuerpo NI308.6B11 el cual se une a $(GA)_{15}$ con CE_{50} de aproximadamente 38.4, $(GR)_{15}$ con una CE_{50} de aproximadamente 0.94 y a $(PR)_{15}$ con una CE_{50} de aproximadamente 119; véase Ejemplo 3 y figuras 2A-2M.

[23] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [22], el cual tiene una afinidad de unión a por lo menos una DPR_n o proteína de DPR_n correspondiente a un valor de CE_{50} (mitad de la concentración efectiva máxima) de ≤ 25 nM, de preferencia ≤ 2 nM, de manera más preferida ≤ 1 nM y más preferido aún ≤ 0.5 nM según se determina mediante ELISA indirecta, en el cual el número de repetición n es 15.

[24] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [23], el cual es un anticuerpo quimérico de múrido-humano o un anticuerpo murinizado.

[25] Un anticuerpo o molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo de cualquiera de [1] a [24] para unión específica a una DPR o DPR-proteína tal como se define en

cualquiera de [1] a [24].

[26] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [25], el cual se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fv de cadena individual (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab), y un fragmento $F(ab')_2$.

[27] Un polinucleótido que codifica para por lo menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de cualquiera de [1] a [26], de preferencia en el cual el polinucleótido es un ADNc.

[28] Un vector que comprende el polinucleótido de [7], opcionalmente en combinación con un polinucleótido de [27] que codifica para la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de dicha molécula de unión.

[29] Una célula hospedera que comprende un polinucleótido de [27] por un vector de [28].

[30] El uso del ADNc de [27], el vector de [28], la célula hospedera de [29] para la producción de un anticuerpo anti-DPR.

[31] Un método para preparar un anticuerpo anti-DPR o un derivado biotecnológico o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo, dicho método comprende

(a) cultivar la célula de [30]; y

(b) aislar el anticuerpo o cadena(s) de inmunoglobulina del

mismo a partir del cultivo.

[32] Un anticuerpo o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo codificado por un polinucleótido de [27] u obtenible mediante el método de [31].

[33] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [26] o [32], el cual está marcado de manera detectable.

[34] El anticuerpo de [33], en el cual la marca detectable se selecciona a partir del grupo que consiste de una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo, y un metal pesado.

[35] El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones [1] a [26] o [32], el cual está unido a un fármaco.

[36] Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [26] o [32] a [34], el polinucleótido de [27], el vector de [28] o la célula de [29].

[37] La composición de [36], la cual es una composición farmacéutica y comprende también un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[38] La composición de [37], la cual es una vacuna.

[39] Un método para preparar una composición farmacéutica para ser utilizada en el tratamiento de un trastorno asociado con o causado por DPR y agregados de DPR-proteína, el método comprende:

(a) cultivar la célula de [29];

(b) purificar el anticuerpo, derivado biotecnológico o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo a partir del cultivo hasta grado farmacéutico; y

(c) mezclar íntimamente el anticuerpo o derivado biotecnológico del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable

[40] La composición farmacéutica de [36] o [37] que comprende también un agente adicional útil para tratar enfermedades y/o síntomas asociadas con proteínas de DPR agregadas, por ejemplo C9ORF72-DPR.

[41] La composición de [40], la cual es una composición de diagnóstico.

[42] La composición de diagnóstico de [41], la cual comprende reactivos convencionalmente utilizados en métodos de diagnóstico inmuno-basados o basados en ácido nucleico.

[43] Un anticuerpo de cualquiera de [1] a [26] o [32] a [34], o molécula de unión a proteína de DPR que tienen sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, el polinucleótido de [27], el vector de [28] o la célula de [29] para ser utilizado en la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratamiento profiláctico y terapéutico de enfermedades asociadas con proteína de DPR y formas agregadas de la misma.

[44] El anticuerpo de [43] para ser utilizado en la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratamiento profiláctico y terapéutico, en el cual la enfermedad se selecciona a partir del grupo que consiste de degeneración frontotemporal lobular (FTLD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), y FTLD-ALS.

[45] Molécula de unión a proteína de DPR que comprende por lo menos una CDR de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones [1] a [26] o [32] a [35] para ser utilizado in vivo en la detección de o para elegir como blanco un agente terapéutico y/o de diagnóstico para agregado en el cuerpo humano o animal.

[46] Molécula de unión a proteína de DPR de [45], en el cual dicha formación de imagen in vivo comprende tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón individual (SPECT), infrarrojo cercano (NIR), formación de imagen óptica o formación de imagen por resonancia magnética (MRI).

[47] Un método para diagnosticar trastornos asociados con proteína de DPR, que comprende los pasos de determinar la presencia de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones [1] a [26] o [32] a [35] en una muestra biológica de dicho individuo.

[49] Un kit útil en el diagnóstico o monitoreo de trastornos asociados con proteína de DPR, dicho kit comprende por lo menos un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones [1] a [27] o [32] a [35] o una molécula de unión a proteína de DPR que tienen sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, el polinucleótido de [27], el vector de [28] o la célula de [29], opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para su uso.

Las propiedades tóxicas de la expansión de repetición se demostraron en varias enfermedades incluyendo pero sin limitarse a degeneración frontotemporal lobular (FTLD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), FTLD-ALS, y ataxia espinocerebelar tipo 36. Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención el anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse a las DPR en cualquiera de las enfermedades y/o trastornos que se seleccionan a partir del grupo que consiste de degeneración frontotemporal lobular (FTLD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), FTLD-ALS, y/o ataxia espinocerebelar tipo 36. Debido a que las C9ORF72-DPR demostraron estar asociadas con FTLD, véase *supra*, en una modalidad preferida, el anticuerpo de la presente invención se une a repeticiones de dipéptido (DPR) de C9ORF72.

Como se demuestra en los Ejemplos y figuras, los

anticuerpos obtenidos de conformidad con la presente invención se unen a las formas agregadas de las C9ORF72-DPR en pacientes humanos con C9ORF72-FTLD, véase, por ejemplo, los Ejemplos 10 y 12 así como las figuras 9 a 12A-12B y 14A-14C. Por lo tanto, en una modalidad, el anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse a las formas agregadas de las C9ORF72-DPR. Como un aspecto interesante, los anticuerpos obtenidos de conformidad con la presente invención también se unen a las formas co-agregadas de las C9ORF72-DPR en pacientes humanos con C9ORF72-FTLD; véase el Ejemplo 13 y la figura 15. Por lo tanto, en otras modalidades el anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse a las formas co-agregadas de las C9ORF72-DPR.

En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión, derivado sintético o biotecnológico del mismo demuestra las características de unión inmunológicas de un anticuerpo caracterizado por cualquiera de las regiones variables VH y/o VL como se indica en las figuras 1A-1L. En una modalidad preferida, el anticuerpo de la presente invención comprende en su región variable por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácido de la región variable V_H y/o V_L representada en (i) secuencia de V_H (SEQ ID NOs: 2, 8, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38,

44, 48, 52, 56, 58, 62, 64, 68, 72, 76, 80, 84); y (ii) secuencia de V_L (SEQ ID NOs: 4, 6, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 66, 70, 74, 82, 86, 88).

Además o de manera alternativa, en una modalidad de la presente invención el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de la región V_H y/o V_L como se representa en cualquiera de las figuras 1A-1J.

En una modalidad el anticuerpo de la presente invención de manera adicional o alternativamente comprende por lo menos una CDR que consiste de una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de cualquiera de las secuencias de aminoácido de la secuencia de V_H (SEQ ID NOs: 2, 8, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 62, 64, 68, 72, 76, 80, 84); y (ii) la secuencia de V_L (SEQ ID NOs: 4, 6, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 66, 70, 74, 82, 86, 88). En otra modalidad, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido que resulta de una alteración parcial de la secuencia de aminoácido descrita anteriormente.

En una modalidad adicional de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de manera adicional o alternativamente también comprende

opcionalmente una secuencia de polipéptido la cual es heteróloga para la región V_H y/o V_L o dicha por lo menos una CDR, de preferencia en la cual la secuencia de polipéptido comprende un dominio constante de humano.

En una modalidad preferida, *infra*, el anticuerpo o derivado biotecnológico del mismo es un anticuerpo de isotipo IgG de humano, de preferencia de la clase o isotipo IgG1.

Como se ilustra en los Ejemplos y en las Figuras, se demostró que los anticuerpos anti-proteína de DPR se unen específicamente a las C9ORF72-DPRs con una repetición $(GA)_{15}$ o $(GP)_{15}$ o $(GR)_{15}$ o $(PA)_{15}$ o $(PR)_{15}$. Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención, el anticuerpo de la presente invención o derivado biotecnológico del mismo tiene una afinidad de unión correspondiente a un valor de CE_{50} (mitad de la concentración efectiva máxima) de ≤ 2 nM, de preferencia ≤ 1 nM y más preferido aún ≤ 0.5 nM para unirse a una DPR que consiste de $(XX')_{15}$, de preferencia en la cual la DPR es proteína de DPR $(GA)_{15}$ o proteína de DPR $(GP)_{15}$ proteína de DPR $(GR)_{15}$ o proteína de DPR $(PA)_{15}$ o proteína de DPR $(PR)_{15}$.

Debido a que los anticuerpos anti-DPR con afinidad y especificidad altas hacia repeticiones de dipéptido individuales son de interés en general y los presentes anticuerpos ilustrados en los Ejemplos proveen medios para llegar a anticuerpos

equivalentes y moléculas de unión a DPR similares, la presente invención también se refiere a un anticuerpo o molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo, *supra*, por unión específica a una proteína de DPR.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento Fv de cadena individual, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab), y un fragmento F(ab')2, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno. De manera alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico de humano-roedor o rodentizado tal como anticuerpo de múrido-humano, múrido o murinizado, de rata o ratinizado, siendo las versiones de roedor particularmente útiles para los métodos de diagnóstico y estudios en animales.

Asimismo, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo de la presente invención o fragmento de unión a antígeno, derivado sintético o biotecnológico del mismo y a métodos inmunoterapéuticos y de inmunodiagnóstico que utilizan dichas composiciones en la prevención, diagnosis o tratamiento de enfermedades y/o trastornos asociados con proteínas de DPR y/o C9ORF72 agregada, en los cuales se administra una cantidad efectiva de la composición a un paciente en necesidad de lo mismo.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos

que codifican para por lo menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. De preferencia, dicha región variable comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la VH y/o VL de la región variable como se indica en cualquiera de las figuras 1A-1L.

Por consiguiente, la presente invención también abarca vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células hospederas transformadas con los mismos así como su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes las cuales son específicas para las DPR y de preferencia son capaces de unirse a las proteínas C9ORF72-DPR o fragmentos de la misma. Los medios y métodos para la producción recombinante de anticuerpos e imitadores de los mismos así como los métodos para tamizaje respecto a moléculas de unión competidoras, las cuales pueden ser o no anticuerpos, son conocidos en la técnica. Sin embargo, como se describe en la presente solicitud, en particular con respecto a aplicaciones terapéuticas en humanos el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo derivado de humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de una respuesta inmune dirigida contra dicho anticuerpo de alguna otra manera observada para

anticuerpos quiméricos e incluso humanizados.

Asimismo, en la presente solicitud se describen composiciones y métodos que se pueden utilizar para identificar las DPR, en particular las C9ORF72-DPR o fragmentos *in vitro*, por ejemplo en muestras y/o *in vivo*. Los anticuerpos anti-proteína de DPR descritos y los fragmentos de unión de los mismos se pueden utilizar para tamizar sangre, plasma, suero, saliva, fluido peritoneal, fluido cerebroespinal ("CSF"), y orina de humano respecto a la presencia de especies de DPR y/o C9ORF72-DPR o fragmentos de las mismas en las muestras, por ejemplo, utilizando prueba basada en ELISA o adaptada a superficie. En una modalidad la presente invención se refiere a un método para diagnosticar o monitorear el avance de una enfermedad y/o trastorno relacionado con especies de proteína de DPR o fragmentos de la misma en un individuo, el método comprende determinar la presencia de especies de proteína de DPR o fragmentos en una muestra proveniente del individuo a ser diagnosticado con por lo menos un anticuerpo de la presente invención o molécula de unión a DPR equivalente, en el cual la presencia de la especie de proteína de DPR o fragmentos es indicativa del trastorno. Asimismo, en una modalidad de la presente invención se proveen los anticuerpos anti-DPR y las moléculas de unión a DPR descritos que comprenden por lo

menos una CDR de un anticuerpo de la presente invención para la preparación de una composición para detección *in vivo* (también llamada formación de imagen *in vivo*) de o para dirigir un agente terapéutico y/o de diagnóstico hacia las DPR, en particular especies de C9ORF72-DPR en el cuerpo humano o animal. Los métodos y composiciones descritos en la presente solicitud pueden ayudar en enfermedades y/o trastornos asociados con proteínas de DPR y caracterizadas, por ejemplo, por la ocurrencia de formas agregadas de las DPR y se pueden utilizar para monitorear el avance de la enfermedad y la eficacia terapéutica de la terapia provista al individuo, por ejemplo, en métodos de diagnóstico relacionados con formación de imagen *in vivo*. En una modalidad la detección (formación de imagen) *in vivo* comprende formación de imagen óptica por centelleografía, tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón individual (SPECT), con infrarrojo cercano (NIR) o formación de imagen por resonancia magnética (MRI).

Por lo tanto es un objetivo particular de la presente invención proveer métodos para tratar, diagnosticar o prevenir una enfermedad y/o trastorno asociado con las proteínas de DPR, de preferencia con las C9ORF72-DPR. Los métodos comprenden administrar una concentración efectiva de un anticuerpo de preferencia derivado de humano o derivado

biotecnológico del anticuerpo al individuo en el cual el anticuerpo elige como blanco las DPR y proteínas de DPR, de preferencia las especies de proteína C9ORF72-DPR o fragmentos de la misma.

Las modalidades adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y ejemplos que siguen.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figuras 1A-1L: Secuencias de aminoácido de las regiones variables de los anticuerpos de humano NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI.308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI308-6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10. La región de estructura base (FR) y las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se indican con las CDRs subrayadas. Se utiliza el esquema de numeración de Kabat (cf. http://www.bioinf.org.uk/abs/). Los recuadros indican la CDR1 de V_H como es definida por Kabat *et al.,* U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983) referida en la referencia web mencionada y dada en la Tabla 1, *infra*.

Figuras 2A-2M: Especificidad de unión y determinación de

CE_{50} para proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72. (Figura 2A) Resumen de especificidad de unión y afinidad de NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1 para proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72. Las CE_{50} de anticuerpos NI-308 derivados de humano para los péptidos de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72 $(GA)_{15}$ (■), $(GP)_{15}$ (▲), $(GR)_{15}$ (▼), $(PA)_{15}$ (◆), $(PR)_{15}$ (●) y control de BSA (Δ) se determinan mediante ELISA indirecta. Los anticuerpos NI-308.15O7 (figura 2B), NI-308.28G1 (figura 2C), NI-308.45C2 (figura 2D) y NI-308.18F7 (figura 2E) reconocen específicamente el péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(GA)_{15}$ con afinidad de unión de 0.48 nM, 1.1 nM, 1.1 nM y 1.5 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.24E11 (figura 2F) elige específicamente como blanco el péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(PR)_{15}$ con una CE_{50} de 12.8 nM mientras que el anticuerpo NI-308.16C10 (figura 2M) muestra unión preferencial al péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(PR)_{15}$ con afinidad de unión de 3.5 nM pero también reconoce con afinidad de unión más baja al péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(GA)_{15}$. Los anticuerpos NI-308.5G2 (figura 2G), NI-308.12A3 (figura 2L) y NI-308.46E9 (figura 2H) muestran unión preferencial al péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(GP)_{15}$

con afinidad de unión de 0.88 nM, 2.2 nM y 13.9 nM, respectivamente pero también reconocen con afinidad de unión más baja al péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(GA)_{15}$. Los anticuerpos NI-308.6B11 (figura 2I) y NI-308.46F8 (figura 2J) eligen como blanco de manera preferencial al péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(GR)_{15}$ con afinidad de unión de 0.94 nM y 40.6 nM, respectivamente pero también reconocen con afinidad de unión más baja los péptidos de proteína de DPR de C9orf72 $(GA)_{15}$ y a $(PR)_{15}$. El anticuerpo NI-308.4M1 (figura 2K) muestra unión preferencial al péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(PA)_{15}$ con afinidad de unión de 0.10 nM pero también reconoce con afinidad de unión más baja al péptido de proteína de DPR de C9orf72 $(GA)_{15}$.

Figuras 3A-3M: Determinación de CE_{50} para péptidos de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72 copulados con BSA y no copulados. (Figura 3A) Resumen de las afinidades de unión de NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI308.45C2, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10 a péptidos de DPR de C9orf72 copulados con BSA y no copulados. Determinación de la mitad de la concentración efectiva máxima (CE_{50}) de los anticuerpos NI-308 derivados de humano para péptidos de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72

$(GA)_{15}$, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(PR)_{15}$, $(PA)_{15}$ copulados con BSA (▲) y no copulados (■) o control de BSA (Δ), utilizando ELISA indirecta. Los anticuerpos NI-308.18F7 (figura 3B), NI-308.15O7 (figura 3C), NI-308.28G1 (figura 3D), NI-308.5G2 (figura 3G), NI-308.46E9 (figura 3H), NI-308.4M1 (figura 3K) y NI-308.12A3 (figura 3L) reconocen con afinidades de unión similares los péptidos de proteína de DPR de C9orf72 copulados con BSA y no copulados. Los anticuerpos NI-308.45C2 (figura 3E), NI-308.24E11 (figura 3F) y NI-308.16C10 (figura 3M) eligen como blanco los péptidos de proteína de DPR copulados con BSA con CE_{50} más baja en comparación con los péptidos no copulados. No se detecta unión al péptido de proteína de DPR $(GR)_{15}$ copulado con BSA para los anticuerpos NI-308.6B11 (figura 3I) y NI-308.46F8 (figura 3J).

Figuras 4A-4I: Análisis de especificidad de unión de anticuerpos para DPR derivados de humano a proteínas de agregación no relacionadas. La unión del anticuerpo a mezclas de péptidos de proteína de DPR sentido ($(GA)_{15}$, $(GP)_{15}$ y $(GR)_{15}$) y antisentido ($(PA)_{15}$ y $(PR)_{15}$) DPR y seis proteínas amiloidogénicas no relacionadas se determina mediante ELISA indirecta. Los anticuerpos NI-308.15O7 (figura 4A), NI-308.18F7 (figura 4B), NI-308.28G1 (figura 4C), NI-308.45C2 (figura 4D), NI-308.5G2 (figura 4F) y NI-308.46F8 (figura 4I) muestran unión

a la mezcla de péptidos de proteína DPR sentido con ausencia de unión fuera de objetivo significativa a los analitos no relacionados. El anticuerpo NI-308.46E9 (figura 4G) también elige como blanco la mezcla de péptidos de proteína DPR sentido y de manera adicional muestra unión fuera de objetivo moderada a los analitos no relacionados. El anticuerpo NI-308.24E11 (figura 4E) muestra unión específica a la mezcla de péptidos de proteína de DPR antisentido mientras que el anticuerpo NI-308.6B11 (figura 4H) elige como blanco mezclas de péptidos de DPR tanto sentido como antisentido. Para ambos anticuerpos, no se determina ninguna unión fuera de objetivo significativa a las proteínas amiloideas no relacionadas. Los anticuerpos NI-308 se analizan a concentración 20 nM.

Figuras 5A-5J: Selectividad de unión al anticuerpo NI-308 para proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72. Determinación de la selectividad de unión del anticuerpo para DPR de C9orf72 derivado de humano para péptidos de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72 $(GA)_{15}$, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ y $(PR)_{15}$ copulados con BSA mediante análisis Western blot. La proteína de DPR poli-GA de C9orf72 es reconocida por los anticuerpos NI-308.15O7 (figura 5A), NI-308.18F7 (figura 5B), NI-308.28G1 (figura 5C) y NI-308.45C2 (figura 5D). La proteína de DPR poli-PR es reconocida específicamente por los

anticuerpos NI-308.24E11 (figura 5E) y NI-308.16C10 (figura 5J), en los que el anticuerpo NI-308.16C10 muestra una unión más débil también a la proteína de DPR poli-GA. Los anticuerpos NI-308.5G2 (figura 5F), NI-308.46E9 (figura 5G) y NI-308.12A3 (figura 5I) eligen como blanco la proteína de DPR poli-GP en los que NI-308.5G2 muestra una unión más débil también a la proteína de DPR poli-GA. El anticuerpo NI-308.4M1 (figura 5H) reconoce específicamente la proteína de DPR poli-PA de C9orf72.

Figuras 6A-6C: Unión en solución a proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72. Determinación de anticuerpo para DPR de C9orf72 derivado de humano en unión en solución a los péptidos $(GA)_{15}$, $(PR)_{15}$ y $(GR)_{15}$ mediante análisis de inmunoprecipitación. La proteína de DPR poli-GA de C9orf72 es capturada en solución por los anticuerpos NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.45C2 y NI-308.28G1 (figura 6A). La proteína de DPR poli-PR es precipitada por el anticuerpo NI-308.24E11 (figura 6B) mientras que el anticuerpo NI-308.6B11 captura la proteína de DPR poli-GR. El anticuerpo de control de isotipo NI-43A11 no precipita ninguna de las proteínas de DPR de C9orf72 (figuras 6A-6C).

Figuras 7A-7P: Unión dependiente de la longitud de la repetición de proteínas de DPR de C9orf72 de anticuerpos NI-

308 seleccionados. (Figura 7A) Resumen de la unión dependiente de la longitud de la repetición poli-GA de C9orf72 de anticuerpos NI-308 seleccionados. (Figura 7B) Resumen de unión dependiente de la longitud de la repetición poli-GP de C9orf72 de anticuerpos NI-308 seleccionados. (Figura 7C) Resumen de unión dependiente de la longitud de la repetición poli-GR de C9orf72 de anticuerpos NI-308 seleccionados. (Figura 7D) Resumen de unión dependiente de la longitud de la repetición poli-PR de C9orf72 de anticuerpos NI-308 seleccionados. (Figura 7E) Resumen de unión dependiente de la longitud de la repetición poli-PA de C9orf72 de anticuerpos NI-308 seleccionados. Determinación de la especificidad de unión dependiente de la longitud de la repetición de dipéptido y de la mitad de la concentración efectiva máxima (CE_{50}) de anticuerpos NI-308 derivados de humano para los péptidos de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72 mediante ELISA indirecta. El anticuerpo NI-308.15O7 (figura 7F) se une a los péptidos de proteína de DPR $(GA)_5$, $(GA)_6$, $(GA)_{10}$ y $(GA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de >150 nM, 7.9 nM,.0.37 nM y 0.54 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.18F7 (figura 7G) reconoce los péptidos de proteína de DPR $(GA)_6$, $(GA)_{10}$ y $(GA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de >200 nM, 0.78 nM y 0.83 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.28G1 (figura 7H)

elige como blanco los péptidos de proteína de DPR $(GA)_5$, $(GA)_6$, $(GA)_{10}$ y $(GA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de >200 nM, 6.3 nM, 0.9 nM y 1.1 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.45C2 (figura 7I) se une a los péptidos de proteína de DPR $(GA)_6$, $(GA)_{10}$ y (GA)20 con afinidad de unión a CE_{50} de >200 nM, 7.6 nM and 9.6 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.5G2 (figura 7J y figura 7K) reconoce los péptidos de proteína de DPR $(GP)_5$, $(GP)_6$, $(GP)_{10}$ y $(GP)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de >200 nM, 26.8 nM, 0.94 nM y 0.47 nM, respectivamente y a los péptidos de proteína de DPR $(GA)_6$, $(GA)_{10}$ y $(GA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de >200 nM, 5.7 nM y 18.2 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.6B11 (figura 7L y figura 7M) se une a los péptidos de proteína de DPR $(GR)_3$, $(GR)_4$, $(GR)_5$, $(GR)_6$, $(GR)_{10}$ y $(GR)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de 14.3 nM, 13.2 nM, 0.47 nM, 0,33 nM, 1.3 nM y 0.25 nM, respectivamente y a los péptidos de proteína de DPR $(GA)_6$, $(GA)_{10}$ y $(GA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de >200 nM, 27.7 nM y 33.6 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.46E9 (figura 7N) elige como blanco los péptidos de proteína de DPR $(GP)_{10}$ y $(GP)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de 63.3 nM y 15.5 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.24E11 (figura 7O) reconoce los péptidos de proteína de DPR $(PR)_6$, $(PR)_{10}$ y $(PR)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de >200 nM, 31.7 nM y 11.3 nM,

respectivamente. El anticuerpo NI-308.4M1 (figura 7P) se une a los péptidos de proteína de DPR $(PA)_5$, $(PA)_6$, $(PA)_{10}$ y $(PA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de 26.9 nM, 4,3 nM, 0.06 nM y 0.06 nM, respectivamente.

Figuras 8A-8F: Unión dependiente de la longitud de la repetición de proteína de DPR poli-GA y poli-GP de C9orf72 de anticuerpos NI-308 seleccionados. (Figura 8A) Resumen de unión dependiente de la longitud de la repetición poli-GA de C9orf72 de anticuerpos NI-308 seleccionados. (Figura 8B) Resumen de unión dependiente de la longitud de la repetición poli-GP de C9orf72 de anticuerpos NI-308 seleccionados. Determinación de la especificidad de unión dependiente de la longitud de la repetición de dipéptido y de la mitad de la concentración efectiva máxima (CE_{50}) de anticuerpos NI-308 derivados de humano para péptidos de proteína de repetición de dipéptido poli-GA o poli-GP de C9orf72 mediante ELISA en emparedado. El anticuerpo NI-308.15O7 (figura 8C) se une en solución a los péptidos de proteína de DPR $(GA)_{10}$ y $(GA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de >400 nM y 9.0 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.18F7 (figura 8D) reconoce en solución los péptidos de proteína de DPR $(GA)_{10}$ y $(GA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de 0.34 nM y 0.45 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.28G1 (figura 8E) elige como blanco en

solución los péptidos de proteína de DPR $(GA)_{10}$ y $(GA)_{20}$ con afinidad de unión a CE_{50} de 0.46 nM y 0.40 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.5G2 (figura 8F) reconoce en solución solamente al péptido de proteína de DPR individual $(GP)_{20}$ con una afinidad de unión a CE_{50} de 38.2 nM.

Figura 9: Especificidad y afinidad de unión de los anticuerpos NI-308.18F7 y NI-308.15O7 para preparaciones de péptido de proteína de repetición de dipéptido $(GA)_{20}$ de C9orf72 monomérico y agregado.

Figuras 10A-10B: Caracterización *in vitro* de preparaciones de péptido de proteína de repetición DPR $(GA)_{20}$ de C9orf72 mediante microscopía de transmisión electrónica. Imágenes representativas de preparaciones de péptido de proteína de DPR $(GA)_{20}$ no agregado (monomérico, figura 10A) y agregado tipo fibrilla amiloide (agregado, figura 10B.). Aumento: 66k. Barra de escala: 0.5 µm.

Figuras 11A-11B: Especificidad de unión y determinación de CE_{50} de NI-308.18F7 y NI-308.15O7 para preparaciones de péptido de proteína DPR $(GA)_{20}$ de C9orf72 monomérica y agregada mediante prueba de unión de ELISA indirecta. Especificidad de unión y determinación de CE_{50} de los anticuerpos NI-308.18F7 y NI-308.15O7 para preparaciones de péptido de proteína de DPR $(GA)_{20}$ de C9orf72 monomérica (●) y

agregada (■) utilizando ELISA indirecta. El anticuerpo NI-308.18F7 (figura 11A) reconoce las preparaciones de $(GA)_{20}$ monomérico y agregado con afinidad de unión a CE_{50} de 0.87 nM y 0.89 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.15O7 (figura 11B) se une a las preparaciones de $(GA)_{20}$ monomérico y agregado con afinidad de unión a CE_{50} de 0.53 nM y 0.78 nM, respectivamente.

Figuras 12A-12B: Especificidad de unión y determinación de CE_{50} de NI-308.18F7 y NI-308.15O7 para preparaciones de péptido de proteína DPR $(GA)_{20}$ de C9orf72 monomérico y agregado mediante prueba de unión de ELISA en emparedado. Especificidad de unión y determinación de CE_{50} de los anticuerpos NI-308.18F7 y NI-308.15O7 para preparaciones de péptido de proteína DPR $(GA)_{20}$ de C9orf72 monomérico (●) y agregado (■) en solución utilizando ELISA en emparedado. El anticuerpo NI-308.18F7 (figura 12A) reconoce las preparaciones de $(GA)_{20}$ monomérico y agregado con afinidad de unión a CE_{50} de 0.64 nM y 2.9 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-308.15O7 (figura 12B) se une a las preparaciones de $(GA)_{20}$ monomérico y agregado con una CE_{50} de 6.3 nM y 8.1 nM, respectivamente. No se detecta unión a anticuerpo en ausencia de preparaciones de $(GA)_{20}$ marcadas con histidina (Δ). Las especificidades y afinidades de unión se presentan en forma

resumida en la tabla de la figura 9.

Figura 13: Análisis de integridad del anticuerpo NI-308. Análisis SDS-PAGE seguido por tinción con azul de Coomassie de 5 µg de anticuerpos recombinantes NI-308 anti-DPRs de C9orf72 derivados de humano. Se detectan dos bandas mayores correspondientes a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo en el tamaño esperado.

Figuras 14A-14C: NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 y NI-308.4M1 detectan agregados de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72 patológicos en pacientes con FTLD. (Figura 14A) Los anticuerpos NI-308.18F7, NI-308.15O7 y NI-308.5G2 derivados de humano revelan inclusiones citoplasmáticas neuronales patológicas, inclusiones intranucleares neuronales y neuritas distróficas en la capa de célula granular del cerebelo de todos los tres casos de C9orf72-FTLD analizados. En contraste, el cerebelo de control no neurológico es negativo para tinción con NI-308.18F7, NI-308.15O7 y NI-308.5G2. El anticuerpo comercial C9RANT disponible se utiliza como anticuerpo de control. Se muestran imágenes representativas. (Figura 14B) Imágenes representativas con aumento alto de inclusiones de DPR de C9orf72 neuronales en la capa de célula granular del cerebelo de un caso de C9orf72-FTLD seleccionado detectado por los

anticuerpos NI-308.18F7, NI-308.15O7 y NI-308.5G2. (Figura 14C) Imágenes representativas con aumento alto de inclusiones de DPR de C9orf72 citoplasmáticas e intranucleares neuronales en la capa de célula granular del cerebelo de un caso de C9orf72-FTLD seleccionado detectado por el anticuerpo NI-308.4M1. En contraste, el cerebelo de control no neurológico es negativo para la tinción con NI-308.4M1.

Figura 15: Las proteínas de DPR poli-GA y poli-GP de C9orf72 forman co-agregados. Presencia de co-agregados de proteínas de DPR poli-GA y poli-GP de C9orf72 patológicos en la capa granular del cerebelo de un paciente humano con FTLD que porta las expansiones de repetición de hexanucleótido de C9orf72. NI-308.18F7 reconoce poli-GA de C9orf72 mientras que el anticuerpo NI-308.5G2 detecta específicamente las inclusiones citoplasmáticas e intranucleares de poli-GP de C9orf72. La vasta mayoría de agregados de proteína de DPR poli-GP se co-localizan con agregados de poli-GA. Se muestran imágenes representativas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en términos generales a métodos de inmunoterapia y no invasivos para la detección de

enfermedades y condiciones asociadas con la presencia de proteínas de repeticiones de dipéptido (DPR) y en particular formas agregadas de las mismas. De manera más específica, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes derivados de humano y a fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los cuales han sido generados con base en la información de secuencia obtenida a partir de poblaciones de donadores humanos seleccionados y son capaces de unirse a dichas DPRs, en particular poli-glicina-alanina (Gly-Ala; GA)-DPRs, poli-glicina-prolina (Gly-Pro; GP)-DPRs, poli-glicina-arginina (Gly-Arg; GR)-DPRs, poli-prolina-arginina (Pro-Arg; PR)-DPRs, y/o poli-prolina-alanina (Pro-Ala; PA)-DPRs y antígenos de los mismos. Los anticuerpos monoclonales recombinantes derivados de humano de la presente invención así como los derivados sintéticos y biotecnológicos de los mismos se caracterizan de manera conveniente uniendo específicamente C9ORF72 alterada con repeticiones de hexanucleótido expandidas que forman C9ORF72-repeticiones de dipéptido (DPRs). Como se muestra en los Ejemplos, los anticuerpos recombinantes de la presente invención son altamente específicos como un reactivo de diagnóstico para la detección de DPRs y/o C9ORF72 patológico sin dar falsos positivos y debido al origen humano de las

secuencias que codifica para por lo menos la región variable y las CDRs, respectivamente, y la maduración de los anticuerpos originales en el cuerpo humano se puede esperar razonablemente que sean eficaces y seguros como agente terapéutico.

Además, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales derivados de humano incluyendo cualesquiera derivados biotecnológicos de los mismos como se describe en la presente solicitud para ser utilizados en el tratamiento de pacientes ya sea solos o en combinación con otros agentes utilizados para enfermedades, trastornos y/o síntomas asociados con DPRs, de preferencia en los cuales el anticuerpo de la presente invención está diseñado para ser administrado en forma concomitante con el agente supresor de efectos secundarios adicionales o de manera secuencial antes o después de la administración del mismo. En este contexto, el anticuerpo anti-DPR de la presente invención de preferencia es sustancialmente no inmunogénico en el humano. En una modalidad de la presente invención, se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden tanto un anticuerpo monoclonal derivado de humano de la presente invención como uno o más fármacos utilizados para enfermedades, trastornos y/o síntomas asociados con DPRs.

I. Definiciones

A menos que se indique de otra manera, a un término tal como se utiliza en la presente solicitud se le da la definición como se brinda en el Diccionario Oxford de Bioquímica y Biología Molecular, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpreso en 2003, ISBN 0 19 850673 2.

Se debe indicar que el término “un” o “una” entidad se refiere a una o más de dichas entidades; por ejemplo, se entiende que “un anticuerpo” representa uno o más anticuerpos. Por lo tanto, los términos “un” (o “una”), “uno(a) o más”, y “por lo menos uno(a)” se pueden utilizar de manera intercambiable en la presente solicitud.

Si no se indica específicamente lo contrario, el término “DPR”, es decir proteínas de “repetición de dipéptido”, se utiliza en la presente solicitud para referirse específicamente a unidades repetitivas de dos aminoácidos, en particular debido a una repetición de hexanucleótido expandida en un gen. El término “DPR” y “DPRs” también se utiliza para referirse colectivamente a todos los tipos y formas de DPRs, tales como GA, GR, GP, PA, PR etc. En lo que sigue, la presente invención será descrita principalmente con respecto a anticuerpos que reconocen específicamente DPRs que comprenden o consisten

de cualquiera de GA, de preferencia con 15 repeticiones (GA_{15}), GP, de preferencia con 15 repeticiones (GP_{15}), GR, de preferencia con 15 repeticiones (GR_{15}), o PR, de preferencia con 15 repeticiones (PR_{15}), o PA, de preferencia con 15 repeticiones (PA_{15}) comúnmente observados en las proteínas C9ORF72-DPR encontradas en tejido cerebral de pacientes que padecen de FLTD o ALS. Sin embargo, aunque los anticuerpos anti-C9ORF72-DPR representan una modalidad preferida, la presente invención provee en términos generales anticuerpos anti-proteína de DPR y modalidades correspondientes. Por consiguiente, se enfatiza que en principio cualquier modalidad y elementos correspondientes descritos en la presente solicitud e ilustrados en los Ejemplos y Figuras, a menos que se pueda aplicar específicamente al anti-C9ORF72-DPR solamente, también se pretende que se aplique a cualquier anticuerpo anti-proteína de DPR en general.

Otro ejemplo para una enfermedad relacionada con DPR es ataxia espinocerebelar tipo 36, un trastorno neurodegenerativo lentamente progresivo y un subtipo de la ataxia cerebelar tipo 1 dominante autosómica (ADCA tipo 1) caracterizada por ataxia en el andar y en las extremidades de inicio temprano en el adulto, espasticidad de las extremidades inferiores, disartria, fasciculaciones musculares, atrofia de la lengua e hiperreflexia.

Algunos individuos afectados también pueden desarrollar pérdida auditiva; véase, por ejemplo, Garcia-Murias *et al*,. Brain 135 (2012), 1423-1435. Se demostró que la ataxia espinocerebelar tipo 36 es causada por una expansión heterocigota de la repetición de hexanucleótido GGCCTG intrónica en el gen NOP56 en el cromosoma 20p13; véase, por ejemplo, Garcia-Murias *et al*., Brain 135 (2012), 1423-1435. Ikeda *et al*., Neurology 79 (2012), 333-341, Kobayashi *et al*., Am. J. Hum. Genet. 89 (2011), 121-130.

El término "C9ORF72", si no se indica específicamente de otra manera, se refiere a las formas alteradas del marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 (C9ORF72). El término "C9ORF72" también se utiliza para identificar de manera general las expansiones de hexanucleótido de C9ORF72, que llevan a las C9ORF72-repeticiones de dipéptido (DPRs). Por lo tanto, el término también se utiliza para indicar C9ORF72-DPRs. El término "C9ORF72" también se utiliza para referirse colectivamente a todos los tipos y formas de C9ORF72, tal como C9ORF72 mutada. Las letras agregadas en frente de los términos C9ORF72 se utilizan para indicar el organismo a partir del cual se origina el ortólogo particular, por ejemplo hC9ORF72 para C9ORF72 de humano o mC9ORF72 para origen murino.

Los anticuerpos anti-DPR descritos en la presente solicitud

de preferencia se unen a C9ORF72-repeticiones de dipéptido (DPRs) y epítopes de los mismos. Por ejemplo, en la presente solicitud se describen anticuerpos que se unen específicamente a especies patológicamente alteradas de C9ORF72 o fragmentos de la misma, es decir repeticiones de dipéptido que se traducen de manera no convencional a partir de los transcritos de C9ORF72 de las repeticiones de hexanucleótido de C9ORF72 intrónicas expandidas, así como las formas agregadas de C9ORF72-DPRs o fragmentos de las mismas. El término agregado/(patológicamente) agregado de C9ORF72-DPRs se utiliza en la presente solicitud para referirse específicamente a las formas antes mencionadas. El término “formas agregadas” o “agregados” (patológicos) tal como se utiliza en la presente solicitud describe los productos de una acumulación o formación de aglomerados (cluster) debido a la traducción errónea/patológica de C9ORF72 a partir de los transcritos de C9ORF72 de las repeticiones de hexanucleótido de C9ORF72 intrónicas expandidas. Estos agregados, acumulaciones o formas de aglomerado pueden ser, consistir sustancialmente o consistir tanto de proteína C9ORF72-DPR como de/o fragmentos de la misma. Tal como se utiliza en la presente solicitud, la referencia a un anticuerpo que “se une específicamente”, “se une selectivamente”, o “se une en forma preferente” a las

C9ORF72-DPRs se refiere a un anticuerpo que no se une a otras proteínas no relacionadas; véase, por ejemplo, figuras 4A-4I. Como se muestra en las figuras 4A-4I y en el Ejemplo 5, los anticuerpos de la presente invención no reconocen sustancialmente proteínas formadoras de amiloide no relacionadas que se seleccionan a partir del grupo que consiste de filamento helicoidal pareado (PHF)-tau, TAU, proteína 43 de unión a ADN de respuesta transactiva (TDP-43), transtiretrina (TTR), proteína precursora de amiloide de longitud completa (flAPP) y/o Huntingtina (HTT).

En un ejemplo, un anticuerpo para C9ORF72-DPR descrito en la presente solicitud se puede unir a las DPRs y/o C9ORF72-DPRs o un epítope de las mismas y no muestra unión por encima de aproximadamente 2 veces el fondo para otras proteínas. Un anticuerpo que “se une específicamente” o “se une selectivamente” a una DPR y/o una variante de proteína C9ORF72-DPR se refiere a un anticuerpo que no se une a todas las variantes de proteínas C9ORF72-DPR, es decir no se une a por lo menos algún otro confórmero de C9ORF72. Por ejemplo, en la presente solicitud se describen anticuerpos que se pueden unir de manera preferente a formas de C9ORF72 que muestran repeticiones de hexanucleótido expandidas que forman DPRs tanto in vitro como en tejidos obtenidos a partir de pacientes

con enfermedades asociadas con C9ORF72 o con un riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con C9ORF72; véase, por ejemplo, el Ejemplo 8 y las figuras 7A-7P.

Debido a que los anticuerpos anti-DPR de la presente invención han sido aislados a partir de individuos humanos, los anticuerpos de DPR de la presente invención también se pueden llamar “auto-anticuerpos de humano” o “anticuerpos derivados de humano” con el fin de enfatizar que dichos anticuerpos en efecto fueron expresados inicialmente por los individuos y que no son construcciones sintéticas generadas, por ejemplo, por medio de genotecas de fago que expresan inmunoglobulina de humano o anticuerpos xenogenéicos generados en un animal transgénico que expresa parte del repertorio de inmunoglobulina de humano lo cual hasta hoy en día representa un método común para intentar proveer anticuerpos tipo humano. Por otro lado, el anticuerpo derivado de humano de la presente invención se puede denotar sintético, recombinante, y/o biotecnológico con el fin de distinguirlo de los anticuerpos de suero humano *per se*, los cuales se pueden purificar a través de columna con proteína A o columna de afinidad.

Una ventaja particular de la estrategia terapéutica de la presente invención reside en el hecho de que los anticuerpos de la presente invención se derivan a partir de células B o células

de memoria B provenientes de individuos humanos sanos sin signos de una enfermedad que muestre la ocurrencia de, o que esté relacionada con proteínas de DPR y formas agregadas de las mismas y por lo tanto son, dentro de una cierta probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad clínicamente manifiesta relacionada con proteínas de DPR agregadas tales como C9ORF72-DPR, o de disminuir el riesgo de la ocurrencia de la enfermedad clínicamente manifiesta, o de retrasar el inicio o avance de la enfermedad clínicamente manifiesta.

Típicamente, los anticuerpos de la presente invención también ya han pasado satisfactoriamente a través de la maduración somática, es decir la optimización con respecto a selectividad y efectividad en la unión de afinidad alta para las moléculas de DPR objetivo por medio de variación somática de las regiones variables del anticuerpo. El conocimiento que dichas células in vivo, por ejemplo en un humano, no han sido activadas por medio de proteínas u otras proteínas fisiológicas o estructuras celulares en el sentido de una reacción autoinmune lógica o alérgica también es de gran importancia médica debido a que esto significa una probabilidad considerablemente incrementada de vivir satisfactoriamente a través de las fases de prueba clínica. Por así decirlo, la eficiencia, aceptabilidad y tolerabilidad ya han sido demostradas

antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en por lo menos un individuo humano. Por lo tanto se podría esperar que los anticuerpos anti-DPR derivados de humano de la presente invención, tanto su eficiencia específica de estructuras objetivo como agente terapéutico y su probabilidad disminuida de efectos secundarios incremente significativamente su probabilidad clínica de éxito.

En contraste, los anticuerpos derivados a partir de genotecas de ADNc o de despliegues en fago son moléculas artificiales tales como un anticuerpo humanizado el cual sigue siendo de origen múrido y por lo tanto extraño al cuerpo humano. Por lo tanto la utilidad y eficacia clínica de los anticuerpos terapéuticos puede estar limitada por la producción de anticuerpos anti-fármaco (ADAs), los cuales pueden influir en la eficacia y farmacocinética de los anticuerpos y algunas veces llevan a efectos secundarios graves; véase, por ejemplo, Igawa *et al*., MAbs. 3 (2011), 243-252. En particular, los anticuerpos humanizados o anticuerpos generados con las tecnologías recientes para generación de anticuerpo de humano son, en contraste a los anticuerpos derivados de humano tales como aquellos de la presente invención, propensos a inducir una respuesta de anticuerpo y se ha reportado que estos anticuerpos tipo humano derivados de por ejemplo despliegue

en fago tales como adalimumab inducen la producción de ADA; véase, por ejemplo, Mansour, Br. J. Ophthalmol 91 (2007), 274-276 e Igawa *et al*., MAbs. 3 (2011), 243-252. Por lo tanto, los anticuerpos derivados de humano los cuales no son propensos a respuesta inmune indeseada son más benéficos para el paciente que las moléculas artificiales derivadas a partir de genotecas o despliegues.

Se entiende que el término “péptido” incluye los términos “polipéptido” y “proteína” (los cuales, a veces, se pueden utilizar de manera intercambiable en la presente solicitud) dentro de su significado. De manera similar, los fragmentos de proteínas y polipéptidos también quedan contemplados y se podrían referir en la presente solicitud como “péptido”. No obstante, el término “péptido” de preferencia denota un polímero de aminoácido que incluye por lo menos 5 aminoácidos contiguos, de preferencia por lo menos 10 aminoácidos contiguos, de manera más preferida por lo menos 15 aminoácidos contiguos, incluso de manera más preferida por lo menos 20 aminoácidos contiguos, y de manera particularmente preferida por lo menos 25 aminoácidos contiguos. Además, el péptido de conformidad con la presente invención típicamente tiene no más de 100 aminoácidos contiguos, de preferencia menos de 80 aminoácidos contiguos y de manera más preferida

menos de 50 aminoácidos contiguos.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "polipéptido" pretende abarcar un "polipéptido" singular así como "polipéptidos" plurales, y se refiere a una molécula constituida por monómeros (aminoácidos) ligados linealmente mediante enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" 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", "proteínas", "cadena de aminoácido", o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede utilizar en lugar de, o de manera intercambiable con cualquiera de dichos términos.

El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo sin limitación glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, y derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, corte proteolítico, o modificación mediante aminoácidos que no se presentan normalmente en la Naturaleza. Un polipéptido se puede obtener a partir de una fuente biológica natural o se puede producir

mediante tecnología recombinante, pero no es necesariamente traducido a partir de una secuencia de ácido nucleico diseñada. Este se puede generar en cualquier manera, incluyendo mediante 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 éstos no necesariamente tienen dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida son referidos como plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino más bien pueden adoptar un número grande de diferentes conformaciones, son referidos como no plegados. Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término glucoproteína se refiere a una proteína copulada a por lo menos una porción carbohidrato que está unida a la proteína a través de una cadena lateral que contiene oxígeno o una cadena lateral que contiene nitrógeno de un residuo de aminoácido, por ejemplo, un residuo serina o un residuo asparagina.

Con un polipéptido “aislado” o un fragmento, variante, o derivado del mismo se quiere decir un polipéptido que no está

en su medio natural. No se requiere de un nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede estar retirado de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células hospederas se consideran aislados para los propósitos de la invención, al igual que los polipéptidos recombinantes o nativos los cuales han sido separados, fraccionados, o parcial o sustancialmente purificados mediante cualquier técnica apropiada.

"Péptidos, polipéptidos o proteínas recombinantes" se refiere a péptidos, polipéptidos o proteínas que se producen utilizando técnicas de ADN recombinante, es decir, que se producen a partir de células, microbianas o de mamífero, transformadas mediante una construcción de expresión de ADN recombinante exógena que codifica para la proteína de fusión incluyendo el péptido deseado. Las proteínas o péptidos expresados en la mayoría de cultivos bacterianos típicamente estarán libres de glucano. Las proteínas o polipéptidos expresados en levadura puede tener un patrón de glucosilación diferente al de aquellas expresadas en células de mamífero.

Se incluyen como polipéptidos de la presente invención los fragmentos, derivados, análogos o variantes de los polipéptidos anteriores así como las variantes sintéticas o biológicas y

cualesquiera combinaciones de los mismos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado", y "análogo" incluyen péptidos y polipéptidos que tiene una secuencia de aminoácido lo suficientemente similar a la secuencia de aminoácido del péptido natural. El término "lo suficientemente similar" significa una primera secuencia de aminoácido que contiene un número suficiente o mínimo de residuos de aminoácido idénticos o equivalentes con relación a una segunda secuencia de aminoácido de modo tal que la primera y la segunda secuencias de aminoácido tienen un dominio estructural común y/o actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácido que comprenden un dominio estructural común que es por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 55%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 65%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 91%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 93%, por lo menos aproximadamente 94%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos

aproximadamente 99%, o por lo menos aproximadamente 100%, idéntico son definidas en la presente solicitud como lo suficientemente similares. De preferencia, las variantes serán lo suficientemente similares a la secuencia de aminoácido de los péptidos preferidos de la presente invención, en particular a la proteína C9ORF72 alterada, tal como las C9ORF72-DPRs así como a proteínas de DPR solas, variantes, derivados o análogos de cualquiera de las mismas. Dichas variantes por lo general retienen la actividad funcional de los péptidos de la presente invención. Las variantes incluyen péptidos que difieren en secuencia de aminoácido del péptido nativo y de tipo silvestre, respectivamente, en una o más deleciones, adiciones, y/o sustituciones de aminoácido. Estas pueden ser variantes que ocurran de manera natural así como aquellas diseñadas artificialmente.

Asimismo, los términos “fragmento”, “variante”, “derivado”, y “análogo” cuando se refieren a anticuerpos o polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen cualesquiera polipéptidos que retengan por lo menos algo de las propiedades de unión a antígeno de la molécula, anticuerpo, o polipéptido de unión nativo correspondiente. Los fragmentos de polipéptidos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de deleción, además de fragmentos de

anticuerpo específicos discutidos en alguna otra parte en la presente solicitud. Las variantes de los anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen fragmentos como los descritos anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácido alteradas debido a sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácido. Las variantes pueden ocurrir de manera natural o pueden ser de origen no natural. Las variantes de origen no natural se pueden producir utilizando técnicas de mutagénesis conocidas en el campo. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido conservadoras o no conservadoras. Los derivados de moléculas de unión específicas para proteína de DPR, por ejemplo anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención, son polipéptidos que han sido alterados para que exhiban características adicionales no encontradas en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Los polipéptidos variantes también pueden ser referidos en la presente solicitud como “análogos de polipéptido”. Tal como se utiliza en la presente solicitud un “derivado” de una molécula de unión o fragmento de la misma, un anticuerpo, un polipéptido de anticuerpo se refiere a un polipéptido de la presente que tiene uno o más residuos químicamente derivatizados mediante

reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como “derivados” aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácido de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo 4-hidroxiprolina puede ser sustituido por prolina; 5-hidroxilisina puede ser sustituido por lisina; 3-metilhistidina puede ser sustituido por histidina; homoserina puede ser sustituido por serina; y ornitina puede ser sustituido por lisina.

Determinación de similitud y/o identidad de las moléculas

La “similitud” entre dos péptidos se determina comparando la secuencia de aminoácido de un péptido con la secuencia de un segundo péptido. Un aminoácido de un péptido es similar al aminoácido correspondiente de un segundo péptido si este es idéntico o una sustitución de aminoácidos conservadora. Las sustituciones conservadoras incluyen aquellas descritas en Dayhoff, M.O., ed., The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978), y en Argos, EMBO J. 8 (1989), 779-785. Por ejemplo, los aminoácidos que pertenecen a uno de los siguientes grupos representan cambios o sustituciones conservadoras: -Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; -Cys, Ser, Tyr, Thr; -Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; -Lys, Arg, His; -Phe, Tyr, Trp, His; y -Asp, Glu.

La “similitud” entre dos polinucleótidos se determina comparando la secuencia de ácido nucleico de un polinucleótido con la secuencia de un polinucleótido. Un ácido nucleico de un polinucleótido es similar al ácido nucleico correspondiente de un segundo polinucleótido si éste es idéntico o, si el ácido nucleico es parte de una secuencia codificadora, el triplete respectivo que comprende al ácido nucleico codifica para el mismo aminoácido o para una sustitución de aminoácido conservadora. La determinación del por ciento de identidad o similitud entre dos secuencias de preferencia se logra utilizando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas BLASTn y BLASTp de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 disponible en NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cge).

La determinación del por ciento de identidad o similitud se realiza con los parámetros estándar de los programas BLASTn para las búsquedas de polinucleótido BLAST y los programas BLASTp para la búsqueda de proteína BLAST, tal como se recomienda en el sitio web del NCBI y en la “guía de selección del programa BLAST” con respecto a secuencias de una longitud y composición específica.

Las búsquedas de polinucleótido BLAST se realizan con el

programa BLASTn.

Para los parámetros generales, la casilla “secuencias objetivo máximas” (“Max Target Sequences”) se puede ajustar a 100, la casilla “consultas cortas” (“Short queries”) podría marcarse, la casilla “umbral esperado” (“Expect threshold”) se puede ajustar a 1000 y la casilla “tamaño de palabra” (“Word Size”) se puede ajustar a 7 como se recomienda para secuencias cortas (menos de 20 bases) en el sitio web del NCBI. Para secuencias más largas la casilla “Expect threshold” se puede ajustar a 10 y la casilla “Word Size” se puede ajustar a 11. Para los parámetros de puntuación la casilla “puntuaciones de Coincidencia/No coincidencia” (“Match/mismatch Scores”) se puede ajustar a 1,-2 y la casilla “Costos de hueco” (“Gap Costs”) se puede ajustar a lineal. Para los parámetros de filtros y enmascaramiento (Filters and Masking), la casilla “regiones de baja complejidad” (“Low complexity regions”) podría no marcarse, la casilla “repeticiones específicas de especie” (“Species-specific repeats”) podría no marcarse, la casilla “máscara para tabla de asignación solamente” (“Mask for lookup table only”) podría marcarse, la casilla “parámetros de filtro DUST” (“DUST Filter Settings”) podría marcarse y la casilla “enmascarar letras minúsculas” (“Mask lower case letters”) podría no marcarse. En general la “búsqueda de coincidencias

cortas casi exactas" ("Search for short nearly exact matches") se podría utilizar en este sentido, lo cual provee la mayoría de los parámetros antes indicados. La información adicional en este respecto se puede encontrar en la "guía de selección del programa BLAST" ("BLAST Program Selection Guide") publicada en el sitio web del NCBI.

Las búsquedas de proteína BLAST se realizan con el programa BLASTp. Para los parámetros generales, la casilla "secuencias objetivo máximas" ("Max Target Sequences") se puede ajustar a 100, la casilla "consultas cortas" ("Short queries") podría marcarse, "umbral esperado" ("Expect threshold") se puede ajustar a 10 y la casilla "tamaño de palabra" ("Word Size") se puede ajustar a "3". Para los parámetros de puntuación la casilla "Matriz" ("Matrix") se puede ajustar a "BLOSUM62", la casilla "Costos de hueco" ("Gap Costs") se puede ajustar a "Existencia: 11 Extensión: 1", la casilla "Ajustes de Composición" ("Compositional adjustments") se puede ajustar a "ajuste de matriz de puntuación de composición condicional" ("Conditional compositional score matrix adjustment"). Para los parámetros Filtros y Enmascaramiento (Filters and Masking) la casilla "regiones de baja complejidad" ("Low complexity regions") podría no marcarse, la casilla "máscara para tabla de asignación

solamente" ("Mask for lookup table only") podría no marcarse y la casilla "enmascarar letras minúsculas" ("Mask lower case letters") podría no marcarse.

Las modificaciones de ambos programas, por ejemplo, con respecto a la longitud de las secuencias investigadas, se realizan de conformidad con las recomendaciones en la "Guía de selección del programa BLAST" publicada en una versión HTML y una versión PDF en el sitio web del NCBI.

Polinucleótidos

El término "polinucleótido" pretende abarcar un ácido nucleico singular así como ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como el que se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a cualquiera de uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Con ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se quiere decir una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, la cual ha sido retirada de su entorno nativo. Por ejemplo, un

polinucleótido recombinante que codifica para un anticuerpo contenido en un vector es considerado como aislado para los propósitos de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospederas heterólogas o polinucleótidos purificados (parcialmente o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de conformidad con la presente invención también incluyen moléculas como las producidas mediante síntesis. 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 transcripción.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, una “región codificadora” es una porción de ácido nucleico la cual consiste de codones traducidos como aminoácidos. Aunque un “codón de detención” (TAG, TGA o TAA) no es traducido como un aminoácido, éste podría ser considerado como parte de una región codificadora, pero cualesquiera secuencias de flanqueo, por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosoma, terminadores de transcripción, intrones y similares, no son parte de una región codificadora. Pueden estar presentes dos o más

regiones codificadoras de la presente invención en una construcción de polinucleótido individual, por ejemplo, en un vector individual, o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Asimismo, cualquier vector puede contener una región codificadora individual, o puede comprender dos o más regiones codificadoras, por ejemplo, un vector individual puede codificar por separado para una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, un polinucleótido, o ácido nucleico de la invención puede codificar para regiones codificadoras heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica para una molécula de unión, un anticuerpo, o fragmento, variante, o derivado del mismo. Las regiones codificadoras heterólogas incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tal como un péptido de señal secretora o un dominio funcional heterólogo.

En algunas modalidades, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico el cual codifica para un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de transcripción o traducción asociados de manera operable con una o más regiones codificadoras. Una asociación

operable es cuando una región codificadora para un producto de gen, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras de tal manera que colocan la expresión del producto de gen bajo la influencia o control de la secuencia o secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificadora de polipéptido y un promotor asociado con la misma) están “asociados de manera operable” o “ligadas de manera operable” si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción del ARNm que codifica para el producto de gen deseado y si la naturaleza del enlazamiento entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de expresión para dirigir la expresión del producto de gen o no interfiere con la capacidad de la plantilla de ADN que se va a transcribir. Por lo tanto, una región promotora estará asociada de manera operable con un ácido nucleico que codifica para un polipéptido si el promotor es capaz de efectuar la transcripción de dicho ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirija la transcripción sustancial del ADN solamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de transcripción, además de un promotor, por ejemplo incrementadores, operadores, represores, y señales de terminación de transcripción, pueden estar asociados de manera operable con

el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Los promotores apropiados y otras regiones de control de transcripción se describen en la presente solicitud.

Una variedad de regiones de control de transcripción son conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de transcripción las cuales funcionan en células de vertebrados, tales como, pero sin limitarse a, segmentos de promotor e incrementador provenientes de citomegalovirus (el promotor inmediato temprano, en conjunto con el intrón-A), virus 40 de simio (el promotor temprano), y retrovirus (tal como el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de transcripción incluyen aquellas derivadas a partir de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y β-globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión de gen en células eucariotas. Las regiones de control de transcripción apropiadas adicionales incluyen promotores e incrementadores específicos de tejido así como promotores inducibles por linfocina (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

De manera similar, una variedad de elementos de control de traducción son conocidos por los expertos en la técnica. Éstos incluyen, pero no se limitan a sitios de unión a ribosoma,

codones de iniciación y terminación de traducción, y elementos derivados a partir de picornavirus (particularmente un sitio de ingreso a ribosoma interno, o IRES, también referido como una secuencia CITE).

En otras modalidades, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

Las regiones codificadoras de polinucleótido y de ácido nucleico de la presente invención pueden estar asociadas con regiones codificadoras adicionales las cuales codifican para péptidos secretores o péptidos de señal, los cuales dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. De conformidad con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido de señal o secuencia líder secretora la cual es cortada de la proteína madura una vez que se inicia la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la técnica están conscientes de que los polipéptidos secretados por células de vertebrado por lo general tienen un péptido de señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, el cual es cortado a partir del polipéptido completo o de “longitud completa” para producir una forma secretada o “madura” del

polipéptido. En algunas modalidades, se utiliza el péptido de señal nativo, por ejemplo, un péptido de señal de la cadena pesada o de la cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de dicha secuencia que conserva la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está asociado de manera operable con el mismo. De manera alternativa, se puede utilizar un péptido de señal heterólogo de mamífero, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede ser sustituida con la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular de humano (TPA) o β-glucuronidasa de ratón.

Una “molécula de unión” tal como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere principalmente a anticuerpos, y fragmentos de los mismos, pero también se puede referir a otras moléculas tipo no anticuerpo que se unen a las proteínas de repetición de dipéptido (DPR), de preferencia las cuales se unen a C9ORF72 alterada, en particular C9ORF72-DPRs (patológicamente) alteradas, incluyendo pero sin limitarse a hormonas, receptores, ligandos, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), chaperones tales como proteínas de choque térmico (HSPs) así como moléculas de adhesión célula-célula tal como los miembros de las superfamilias de cadherina, intergrina, lectina tipo C e inmunoglobulina (Ig). Por

lo tanto, en aras de la claridad solamente y sin restringir el alcance de la presente invención la mayoría de las siguientes modalidades se discuten con respecto a anticuerpos y moléculas tipo anticuerpo las cuales representan las moléculas de unión preferidas para el desarrollo de agentes terapéuticos y de diagnóstico.

Anticuerpos

Los términos “anticuerpo” y “inmunoglobulina” se utilizan de manera intercambiable en la presente solicitud. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión que comprende por lo menos el dominio variable de una cadena pesada, y normalmente comprende por lo menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas vertebrados están relativamente bien entendidas; véase, por ejemplo, Harlow *et al*., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

Como se discutirá con mayor detalle más adelante, el término “inmunoglobulina” comprende diversas clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilón, (γ, μ, α, δ, ε)

con algunas subclases entre las mismas (por ejemplo, γ1-γ4). Es la naturaleza de ésta 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. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos pueden ser discernidas fácilmente por el experto en la técnica en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulina están claramente dentro del alcance de la presente invención, la siguiente discusión estará dirigida en términos generales a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de la cadena ligera idénticos de peso molecular de aproximadamente 23,000 Daltons, y dos polipéptidos de la cadena pesada idénticos de peso molecular 53,000-70,000. Las cuatro cadenas típicamente están unidas mediante puentes de disulfuro en una configuración de "Y" en la cual las cadenas ligeras sujetan las cadenas pesadas comenzando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican ya sea como kappa o lambda (κ, λ). Cada clase de la cadena pesada puede estar

unida con cualquiera de una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de “cola” de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlazamientos de disulfuro covalentes o enlazamientos no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas ya sea por hibridomas, células B o células hospederas genéticamente diseñadas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácido corren desde un extremo N-terminal en los extremos en horquilla de la configuración en Y hacia el extremo C-terminal en el fondo de cada cadena.

Tanto las cadenas pesada como ligera se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos “constante” y “variable” se utilizan funcionalmente. En este sentido, se apreciará que los dominios variables de las porciones tanto de la cadena ligera (V_L) como de la cadena pesada (V_H) determinan el reconocimiento y especificidad de antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas tales como secreción, motilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión al complemento, y similares. Por convención la numeración de los dominios de la región constante se incrementa a medida que

éstos se vuelven más distales del sitio de unión a antígeno o extremo amino terminal del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y en la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL realmente constituyen el extremo carboxi terminal de la cadena pesada y de la cadena ligera, respectivamente.

Como se indicó anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y específicamente unirse a los epítopes en los antígenos. Es decir, el dominio V_L y el dominio V_H, o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión a antígeno presente al final de cada brazo de la Y. De manera más específica, el sitio de unión a antígeno queda definido por tres CDRs en cada una de las cadenas V_H y V_L. Cualquier fragmento de anticuerpo o inmunoglobulina que contenga estructura suficiente para unirse específicamente a las DPRs, en particular a C9ORF72 alterada que forma C9ORF72-DPRs se denota en la presente solicitud de manera intercambiable como un “fragmento de unión” o un “fragmento inmunoespecífico”.

Como se describe en el Ejemplo 11 y se muestra en la

figura 13, los anticuerpos de la presente invención cuando se expresan como IgG, de preferencia IgG1 en células de mamífero, en particular células CHO-S demuestran alta integridad con respecto a las porciones tanto de la cadena ligera (V_L) como de la pesada (V_H) mientras que no se pueden detectar contaminaciones significativas o productos de degradación proteolítico.

En los anticuerpos que ocurren de manera natural, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables, algunas veces llamadas “regiones determinantes de complementariedad” o “CDRs” presentes en cada dominio de unión a antígeno, las cuales son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que están posicionados específicamente para formar el dominio de unión a antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Las “CDRs” están flanqueadas por cuatro regiones de “estructura base” relativamente conservadas o “FRs” las cuales muestran menos variabilidad inter-molecular. Las regiones de estructura base en gran medida adoptan una conformación de lámina β y las CDRs forman asas las cuales conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Por lo tanto, las regiones de estructura base actúan para formar un andamio que provee el posicionamiento de las CDRs en la orientación correcta

mediante interacciones inter-cadena, no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDRs posicionadas define una superficie complementaria al epítope en el antígeno inmuno-reactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítope cognado. Los aminoácidos que constituyen la CDRs y las regiones de estructura base, respectivamente, pueden ser identificados fácilmente para cualquier región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera dada por un experto en la técnica, debido a que estas han sido definidas de manera precisa; 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), 901-917, las cuales se incorporan en la presente solicitud para referencia en sus totalidades.

En el caso en el cual existan dos o más definiciones de un término que sea utilizado y/o aceptado dentro de la técnica, la definición del término tal como se utiliza en la presente solicitud pretende incluir a todos de dichos significados a menos que explícitamente se indique lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación a antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de los

polipéptidos tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. Esta región particular ha sido descrita 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), 901-917, las cuales se incorporan en la presente solicitud para referencia, en la cual las definiciones incluyen traslapes o subconjuntos de residuos de aminoácido cuando se comparan una contra la otra. No obstante, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende estar dentro del alcance del término como se define y utiliza en la presente solicitud. Los residuos de aminoácido apropiados que abarcan las CDRs como es definido por cada una de las referencias antes citadas se indican a continuación en la Tabla 1 como una comparación. Los números de residuo exactos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica puedan determinar de manera rutinaria cuales residuos constituyen una región hipervariable o CDR particular del subtipo IgG de humano de anticuerpo dada la secuencia de aminoácido de la región variable del anticuerpo.

TABLA I

Definiciones de CDR[1]

	Kabat	**Chothia**
CDR1 de V_H	31-35	26-32
CDR2 de V_H	50-65	52-58
CDR3 de V_H	95-102	95-102
CDR1 de V_L	24-34	26-32
CDR2 de V_L	50-56	50-52
CDR3 de V_L	89-97	91-96

[1] La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla 1 es de conformidad con las convenciones de numeración establecidas por Kabat *et al*. (Véase más adelante)

Kabat *et al.* también definen un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar de manera inequívoca este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender en algún dato experimental más allá de la secuencia misma. Tal como se utiliza en la presente solicitud, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración indicado por Kabat *et al.,* U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique de otra manera, las referencias a la numeración de posiciones de residuo de aminoácido específicas en un anticuerpo o fragmento

de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención están de conformidad con el sistema de numeración de Kabat, el cual sin embargo, es teórico y podría no aplicarse igualmente a cada anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, dependiendo de la posición de la primera CDR las siguientes CDRs podrían estar desplazadas en cualquier dirección.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos inmunoespecíficos, variantes, o derivados de los mismos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados, murinizados o quiméricos, anticuerpos de cadena individual, fragmentos de unión a epítope, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')2, Fd, Fvs, Fvs de cadena individual (scFv), anticuerpos de cadena individual, Fvs ligados con disulfuro (sdFv), fragmentos que comprende cualquiera de un dominio de V_L o V_H, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para los anticuerpos descritos en la presente solicitud). Las moléculas de scFv son conocidas en la técnica y son descritas, por ejemplo en la patente E.U.A. 5,892,019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de

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

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado de la misma con una estructura pentavalente. Particular, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente uso terapéutico, las IgMs son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos divalentes o moléculas de unión correspondientes debido a que las IgMs por su estructura pentavalente y falta de maduración por afinidad con frecuencia muestran reactividades cruzadas no específicas y afinidad muy baja. En una modalidad particularmente preferida, el anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo policlonal, es decir éste consiste sustancialmente de una especie de anticuerpo particular en vez de ser una mezcla obtenida a partir de una muestra de inmunoglobulina de plasma.

Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos de cadena individual, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una porción de las siguientes: región de gozne, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención los fragmentos de unión a DPR los cuales comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región de gozne, los dominios CH1,

CH2 y CH3. Los anticuerpos o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos de la presente invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. De preferencia, los anticuerpos son anticuerpos de humano, de múrido, de asno, de conejo, de cabra, de cobayo, de camello, de llama, de caballo o de pollo. En otra modalidad, la región variable puede ser de origen condrictoide (por ejemplo proveniente de tiburones).

En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal de humano aislado a partir de un humano. De manera opcional, la región de estructura base del anticuerpo de humano se alinea y adopta de conformidad con las secuencias de región variable de línea germinal de humano pertinentes en la base de datos; véase, por ejemplo Vbase (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) alojada por MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, RU). Por ejemplo, los aminoácidos considerados como potencialmente desviados de la secuencia de línea germinal verdadera podrían deberse a las secuencias de iniciador para PCR incorporadas durante el proceso de clonación. En comparación con los anticuerpos tipo humano generados artificialmente tales como fragmentos de anticuerpo de cadena individual (scFv) provenientes de una genoteca de anticuerpo desplegada en fago o de ratones xenogenéicos el anticuerpo monoclonal de humano de la

presente invención se caracteriza por (i) ser obtenido utilizando la respuesta inmune humana en vez de aquella de substitutos animales, es decir, el anticuerpo ha sido generado en respuesta a las DPRs naturales y proteínas de DPR, de preferencia C9ORF72-DPRs en su conformación relevante en el cuerpo humano, (ii) han protegido al individuo o es por lo menos significativo para la presencia de DPRs, de preferencia C9ORF72-DPRs, y (iii) debido a que el anticuerpo es de origen humano los riesgos de reactividad cruzada contra auto-antígenos está reducida al mínimo; véase también *supra*. Por lo tanto, de conformidad con la presente invención los términos "anticuerpo monoclonal de humano", "auto-anticuerpo monoclonal de humano", "anticuerpo de humano" y similares se utilizan para denotar una molécula de unión a DPR la cual es de origen humano, es decir la cual ha sido aislada a partir de una célula de humano tal como una célula B o hibridoma del mismo o del ADNc del cual ha sido clonado directamente a partir de ARNm de una célula de humano, por ejemplo una célula B de memoria humana, un anticuerpo de humano todavía es "humano", es decir derivado de humano incluso si se hacen sustituciones de aminoácido en el anticuerpo, por ejemplo, para mejorar las características de unión. En este contexto, contrario a los anticuerpos humanizados y anticuerpos de alguna otra

manera tipo humano, véase también la discusión infra, los anticuerpos derivados de humano de la presente invención se caracterizan por comprender CDRs las cuales han sido vistas por el cuerpo humano y por lo tanto están sustancialmente carentes del riesgo de ser inmunogénicas. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención puede incluso ser denotado como derivado de humano sí por lo menos una, de preferencia dos y de manera más preferida todas las tres CDR de una o ambas de las cadenas ligera y pesada variables del anticuerpo se derivan a partir de los anticuerpos de humano ilustrados en la presente solicitud.

En una modalidad los anticuerpos derivados de humano de la presente invención comprenden regiones heterólogas comparadas con los anticuerpos de origen natural, por ejemplo sustituciones de aminoácido en la región de estructura base, región constante fusionada de manera exógena a la región variable, aminoácidos diferentes en los extremos C-terminal o N-terminal y similares.

Los anticuerpos derivados a partir de genotecas de inmunoglobulina de humano o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas de humano y aquellos que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe infra y, por ejemplo en, patente E.U.A. no. 5,939,598 para

Kucherlapati *et al*., se denotan anticuerpos tipo humano con el fin de distinguirlos de los anticuerpos verdaderamente humanos de la presente invención. Por ejemplo, el apareamiento de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos tipo humano tales como los anticuerpos sintéticos y semi-sintéticos típicamente aislados a partir de despliegue en fago no necesariamente reflejan el apareamiento original tal como éste ocurre en la célula B de humano original. Por consiguiente los fragmentos Fab y scFv obtenidos a partir de genotecas de expresión recombinantes como se utiliza comúnmente en la técnica antecedente pueden ser considerados como artificiales con todos los posibles efectos asociados sobre la inmunogenicidad y estabilidad. En contraste, la presente invención provee anticuerpos madurados por afinidad aislados a partir de individuos humanos seleccionados, los cuales están caracterizados por su utilidad terapéutica y su tolerancia en el ser humano.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “anticuerpo rodentizado” o “inmunoglobulina rodentizada” se refiere a un anticuerpo que comprende una o más CDRs provenientes de un anticuerpo de humano de la presente invención; y una región de estructura base de humano que contiene sustituciones y/o deleciones y/o inserciones de aminoácido que están basadas en una secuencia de anticuerpo

de roedor. Cuando se hace referencia a roedores, de preferencia se utilizan secuencias que se originan en ratones y ratas, en las cuales los anticuerpos que comprenden dichas secuencias son referidos como “murinizados” o “ratinizados” respectivamente. La inmunoglobulina de humano que provee las CDRs se denomina la “progenitora” o “aceptora” y el anticuerpo de roedor que provee los cambios de estructura base se denomina el “donador”. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si éstas están presentes, éstas son de manera usual sustancialmente idénticas a las regiones constantes del anticuerpo de roedor, es decir por lo menos 85% a 90%, de preferencia aproximadamente 95% o más idéntica. Por lo tanto, en algunas modalidades, una inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera de humano murinizada de longitud completa contiene una región constante de ratón, CDRs de humano, y una estructura base sustancialmente humana que tiene un número de sustituciones de aminoácido “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 podría no abarcar un anticuerpo quimérico típico, por ejemplo, debido a que la región variable completa de un anticuerpo quimérico no proviene de ratón. Un anticuerpo

modificado que ha sido “murinizado” mediante el procedimiento de “murinización” se une al mismo antígeno que el anticuerpo progenitor que provee las CDRs y usualmente es menos inmunogénico en ratones, en comparación con el anticuerpo progenitor. Las explicaciones anteriores con respecto a los anticuerpos “murinizados” se aplican de manera análoga para otros anticuerpos “rodentizados”, tal como los “anticuerpos ratinizados”, en los cuales se utilizan secuencias de rata en lugar de múrido.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “porción de cadena pesada” incluye secuencias de aminoácido derivadas a partir de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende por lo menos uno de: un dominio CH1, un dominio de gozne (por ejemplo, región de gozne superior, intermedia y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión para ser utilizado en la invención puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, por lo menos una porción de un dominio de gozne, y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, por lo

menos una porción de un dominio de gozne y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, por lo menos una porción de un dominio de gozne, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra modalidad, un polipéptido de la invención comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para ser utilizado en la invención puede carecer por lo menos de una porción de un dominio CH2 (por ejemplo todo o una parte de un dominio CH2). Como se indicó anteriormente, el experto en la técnica entenderá que estos dominios (por ejemplo las porciones de cadena pesada) se pueden modificar de modo tal que estos varíen de la molécula de inmunoglobulina de origen natural en la secuencia de aminoácido.

En algunos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en la presente solicitud, las porciones de la cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticas a aquellas en una segunda cadena polipeptídica del multímero. De manera alternativa, los monómeros que contienen la porción de la cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión a objetivo diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o diacuerpo.

En otra modalidad, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en la presente solicitud están constituidos por una sola cadena polipeptídica tal como los scFvs iban a ser expresados de manera intracelular (intracuerpos) para aplicaciones potenciales terapéuticas y de diagnóstico in vivo.

Las porciones de la cadena pesada de un polipéptido de unión para ser utilizadas en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente solicitud se pueden derivar a partir de moléculas de inmunoglobulina diferentes. Por ejemplo, una porción de la cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado a partir de una molécula de IgG1 y una región de gozne derivada a partir de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de la cadena pesada puede comprender una región de gozne derivada, en parte, a partir de una molécula de IgG1 y, en parte, a partir de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de la cadena pesada puede comprender un gozne quimérico derivado, en parte, a partir de una molécula de IgG1 y, en parte, a partir de una molécula de IgG4.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “porción de la cadena ligera” incluye secuencias de aminoácido derivadas a partir de una cadena ligera de inmunoglobulina. De

preferencia, la porción de la cadena ligera comprende por lo menos uno de un dominio VL o dominio CL.

Se cree que el tamaño mínimo de un epítope peptídico o polipeptídico para un anticuerpo es de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopes peptídicos o polipeptídicos de preferencia contienen por lo menos siete, de manera más preferida por lo menos nueve y de manera más preferida aún entre por lo menos aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 aminoácidos. Debido a que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítope no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, podrían incluso no estar en la misma cadena peptídica. En la presente invención, un epítope peptídico o polipeptídico reconocido por los anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, de manera más preferida por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, o entre aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de DPRs tales como GA_{15} como se encuentra en las C9ORF72-DPRs. Dicho en otras palabras, el anticuerpo de la presente invención o derivado biotecnológico del mismo de preferencia reconoce una DPR con un número de

repetición de dipéptido que consiste de dos aminoácidos diferentes X y X' (XXX y XXX'; XaaXaa') de por ejemplo 3 a 50, de preferencia 10 a 40, más preferido 15 a 30 y de manera más preferible 15. Por lo tanto, un epítope o antígeno reconocido por el anticuerpo de la presente invención o derivado biotecnológico del mismo si consiste de una DPR con un número de repetición de 15 en términos generales puede ser designado $(XX')_{15}$.

Con "que se une específicamente", o "que reconoce específicamente", utilizados de manera intercambiable solicitud en la presente memoria descriptiva, se quiere decir en términos generales que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un epítope a través de su dominio de unión a antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítope. De conformidad con esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítope cuando éste se une a dicho epítope, a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítope aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se utiliza en la presente solicitud para calificar la afinidad relativa mediante la cual un cierto anticuerpo se une a un cierto epítope. Por ejemplo, se puede considerar que el anticuerpo "A" tiene una especificidad más alta para un epítope dado que el anticuerpo "B", o se puede

decir que el anticuerpo “A” se une al epítope “C” con una especificidad más alta que la que tiene para el epítope “D” relacionado.

En donde esté presente, el término “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, y otras características de unión de un anticuerpo.

Con “que se une de manera preferente”, se quiere decir que la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo se une específicamente a un epítope más fácilmente de lo que se uniría a un epítope relacionado, similar, homólogo o análogo. Por lo tanto, un anticuerpo que “se une de manera preferente” a un epítope dado se unirá más probablemente a dicho epítope que a un epítope relacionado, incluso aunque dicho anticuerpo pueda reaccionar de forma cruzada con el epítope relacionado.

A manera de ejemplo no limitativo, se podría considerar que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un primer epítope de manera preferente si éste se une a dicho primer epítope con una constante de disociación (KD) que es menor que la KD del anticuerpo para el segundo epítope. En otro ejemplo no limitativo, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno de manera preferente si

éste se une al primer epítope con una afinidad que sea por lo menos un orden de magnitud menor que la KD del anticuerpo para el segundo epítope. En otro ejemplo no limitativo, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítope de manera preferente si éste se une al primer epítope con una afinidad que sea por lo menos dos órdenes de magnitud menor que la KD del anticuerpo para el segundo epítope.

En otro ejemplo no limitativo, se puede considerar que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un primer epítope de manera preferente si éste se une al primer epítope con una velocidad de disociación ($k_{disoc.}$) que sea menor que la $k_{disoc.}$ del anticuerpo para el segundo epítope. En otro ejemplo no limitativo, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítope de manera preferente si éste se une al primer epítope con una afinidad que sea por lo menos un orden de magnitud menor que la $k_{disoc.}$ del anticuerpo para el segundo epítope. En otro ejemplo no limitativo, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítope de manera preferente si éste se une al primer epítope con una afinidad que sea por lo menos dos órdenes de magnitud menor que la $k_{disoc.}$ del anticuerpo para el segundo epítope.

Se puede decir que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado

descrito en la presente solicitud se une a las DPRs o un fragmento, variante o con formación específica de las mismas con una velocidad de disociación ($k_{disoc.}$) menor que o igual a 5 x 10^{-2} seg^{-1}, 10^{-2} seg^{-1}, 5 x 10^{-3} seg^{-1} o 10^{-3} seg^{-1}. De manera más preferida, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a las proteínas de DPR o un fragmento, variante o conformación específica de las mismas con una velocidad de disociación ($k_{disoc.}$) menor que o igual a 5 x 10^{-4} seg^{-1}, 10^{-4} seg^{-1}, 5 x 10^{-5} seg^{-1}, o 10^{-5} seg^{-1}, 5 x 10^{-6} seg^{-1}, 10^{-6} seg^{-1}, 5 x 10^{-7} seg^{-1} o 10^{-7} seg^{-1}. En una modalidad particularmente preferida, la DPR es una DPR asociada con C9ORF72, es decir C9ORF72-DPR.

Se puede decir que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en la presente solicitud se une a la DPR, o un fragmento, variante o conformación específica de la misma con una velocidad de asociación ($k_{asoc.}$) mayor que o igual a 10^3 M^{-1} seg^{-1}, 5 x 10^3 M^{-1} seg^{-1}, 10^4 M^{-1} seg^{-1} o 5 x 10^4 M^{-1} seg^{-1}. De manera más preferida, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a la DPR o un fragmento, variante o conformación específica de la misma con una velocidad de asociación ($k_{asoc.}$) mayor que o igual a 10^5 M^{-1} seg^{-1}, 5 x 10^5 M^{-1} seg^{-1}, 10^6 M^{-1} seg^{-1}, o 5 x 10^6 M^{-1} seg^{-1} o 10^7 M^{-1} seg^{-1}. En una

modalidad, se puede decir que la molécula de unión se une a C9ORF72-DPR, o un fragmento, variante o conformación específica de la misma con una velocidad de asociación ($k_{asoc.}$) mayor que o igual a 10^3 M^{-1} seg^{-1}, 5 x 10^3 M^{-1} seg^{-1}, 10^4 M^{-1} seg^{-1} o 5 x 10^4 M^{-1} seg^{-1}. De manera más preferida, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a C9ORF72-DPR o un fragmento, variante o conformación específica de la misma con una velocidad de asociación ($k_{asoc.}$) mayor que o igual a 10^5 M^{-1} seg^{-1}, 5 x 10^5 M^{-1} seg^{-1}, 10^6 M^{-1} seg^{-1}, o 5 x 10^6 M^{-1} seg^{-1} o 10^7 M^{-1} seg^{-1}.

Se dice que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de un anticuerpo de referencia a un epítope dado si éste se une de manera preferente a dicho epítope hasta la medida en que éste bloquea, hasta cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítope. La inhibición competitiva se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, pruebas ELISA de competición. Se puede decir que un anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo de referencia a un epítope dado en por lo menos 90%, por lo menos 80%, por lo menos 70%, por lo menos 60%, o por lo menos 50%.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término

"afinidad, se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítope individual con la CDR de una molécula de unión, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina; véase, por ejemplo, Harlow *et al*., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) en las páginas 27-28. Tal como se utiliza en la presente solicitud, 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 29-34. La avidez se relaciona tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopes 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 epítope altamente repetitiva, tal como un polímero, podría ser una de avidez alta. La afinidad o avidez de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar experimentalmente utilizando cualquier método apropiado; véase, por ejemplo, Berzofsky *et al*., "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), y los métodos

descritos en la presente solicitud. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo para un antígeno incluyen ELISA, RIA, y resonancia de plasmón de superficie. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo, KD, CI_{50}, de preferencia se hacen con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y una solución amortiguadora estandarizada.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también se pueden describir o especificar en términos de su reactividad cruzada. Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “reactividad cruzada” se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida de la relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por lo tanto, un anticuerpo presenta reacción cruzada si éste se une a un epítope diferente a aquel que indujo su formación. El epítope que presenta reacción cruzada generalmente contiene muchos de los mismos elementos estructurales complementarios que los del epítope inductor, y en algunos casos, puede

realmente ajustarse mejor que el original.

Por ejemplo, algunos anticuerpos tienen cierto grado de reactividad cruzada, en el sentido que éstos se unen a epítopes relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítopes con por lo menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 65%, por lo menos 60%, por lo menos 55%, y por lo menos 50% de identidad (según se calcula utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente solicitud) con un epítope de referencia. Se puede decir que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si éste no se une a los epítopes 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%, and menos de 50% de identidad (según se calcula utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente solicitud) con un epítope de referencia. Un anticuerpo se puede considerar “altamente específico” para un cierto epítope, si éste no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de dicho epítope.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de las mismas de la invención también se pueden describir o especificar en términos de su afinidad de unión a las DPRs y/o

especies de C9ORF72 mutadas que muestran C9ORF72-DPRs y/o fragmentos de las mismas. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o Kd menor de 5 x 10^{-2} M, 10^{-2} M, 5 x 10^{-3} M, 10^{-3} M, 5 x 10^{-4} M, 10^{-4} M, 5 x 10^{-5} M, 10^{-5} M, 5 x 10^{-6} M, 10^{-6} M, 5 x 10^{-7} M, 10^{-7} M, 5 x 10^{-8} M, 10^{-8} M, 5 x 10^{-9} M, 10^{-9} M, 5 x 10^{-10} M, 10^{-10} M, 5 x 10^{-11} M, 10^{-11} M, 5 x 10^{-12} M, 10^{-12} M, 5 x 10^{-13} M, 10^{-13} M, 5 x 10^{-14} M, 10^{-14} M, 5 x 10^{-15} M, o 10^{-15} M.

Como se indicó previamente, las estructuras de subunidad y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina son bien conocidas. Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “dominio de VH” incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término “dominio CH1” incluye el primer dominio de la región constante (mas amino terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 está adyacente al dominio VH y es amino terminal a la región de gozne de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Tal como se utiliza en la presente solicitud el término “dominio CH2” incluye la porción de una molécula de la cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 hasta el residuo 360 de un anticuerpo utilizando los esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360,

sistema de numeración de Kabat; y los residuos 231-340, sistema de numeración EU; véase Kabat EA et al. op.cit.). El dominio CH2 es único en el sentido que éste no está apareado cercanamente con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidrato ramificadas N-ligadas están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hacia el extremo C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "región de gozne" incluye la porción de una molécula de la cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Está región de gozne comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo por lo tanto que las dos regiones de unión a antígeno N-terminales se muevan de manera independiente. Las regiones de gozne se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios de gozne superior, intermedio e inferior; véase Roux *et al*., J. Immunol. 161 (1998), 4083-4090.

Tal como se utiliza en la presente solicitud el término "puente de 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 de disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayoría de moléculas de IgG de

origen natural, las regiones CH1 y CL están ligadas mediante un puente de disulfuro y las dos cadenas pesadas están ligadas por dos puentes de disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU).

Tal como se utilizan en la presente solicitud, los términos "ligado", "fusionado" o "fusión" se utilizan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a unir entre sí dos o más elementos o componentes, por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión en marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORFs) de polinucleótido para formar un ORF más largo continuo, en una manera que mantenga el marco de lectura de traducción correcto de los ORF originales. Por lo tanto, una proteína de fusión recombinante es una proteína individual que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos no están normalmente unidos de este modo en la Naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace por lo tanto continuo a través de todos los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar física o espacialmente separados, por ejemplo, por la secuencia de enlazador en marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican para las CDR de una región variable de

inmunoglobulina pueden estar fusionados, en marco, pero ser separados por un polinucleótido que codifica para por lo menos una región de estructura base de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, en tanto que las CDR “fusionadas” sean co-traducidas como parte de un polipéptido continuo.

El término “expresión” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un procedimiento mediante el cual un gen produce un bioquímico, por ejemplo, un ARN o polipéptido. El procedimiento incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula, incluyendo, sin limitación, la supresión del gen, así como la expresión transitoria y la expresión estable. Este incluye sin limitación la transcripción del gen como ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN de horquilla pequeño (shRNA), ARN interferente pequeño (siRNA) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción del ARNm como polipéptido(s). Si el producto final deseado es un bioquímico, la expresión incluye la creación de dicho bioquímico y cualesquiera precursores. La expresión de un gen produce un “producto génico”. Tal como se utiliza en la presente solicitud, un producto génico puede ser cualquiera de un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por transcripción de un gen, o un polipéptido el cual es traducido a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en la

presente solicitud incluyen también ácidos nucleicos con modificaciones posteriores a la transcripción, por ejemplo poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones posteriores a la traducción, por ejemplo, metilación, glucosilación, adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteína, corte proteolítico y similares.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "muestra" se refiere a cualquier material biológico obtenido a partir de un individuo o paciente. En un aspecto, una muestra puede comprender sangre, fluido peritoneal, CSF, saliva u orina. En otros aspectos, una muestra puede comprender sangre entera, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, células B enriquecidas a partir de muestras de sangre, y células cultivadas (por ejemplo, células B de un individuo). Una muestra también puede incluir una biopsia o muestra de tejido incluyendo tejido neural. Incluso en otros aspectos, una muestra puede comprender células enteras y/o un lisado de las células. Las muestras de sangre se pueden recolectar mediante métodos conocidos en la técnica.

Enfermedades

A menos que se indique lo contrario, los términos "trastorno" y "enfermedad" se utilizan de manera intercambiable

en la presente solicitud y comprenden cualquier cambio fisiológico no deseado en un individuo, un animal, un órgano aislado, tejido o célula/cultivo celular.

La degeneración (FTLD) es una patogénesis asociada con una atrofia en el lóbulo frontal y el lóbulo temporal del cerebro. De manera adicional, también se demostró que el 50% de los pacientes con FTLD tienen una historia familiar positiva y se compararon con esclerosis lateral amiotrófica (ALS). Como ya se describió anteriormente, la causa subyacente compartida de la patogénesis parece ser una repetición de hexanucleótido expandida heterocigota localizada en el C9ORF72 de pacientes con FTLD y ALS. En particular, se demostró que las unidades repetitivas resultantes de dos aminoácidos (repeticiones dipeptídicas, DPRs).

Sin embargo, las repeticiones de hexanucleótido expandidas que dan como resultado la repetición de dos aminoácidos (DPRs) también se han reportado en varias otras enfermedades y/o trastornos. Las enfermedades incluyen, pero no se limitan a, degeneración frontotemporal lobular (FTLD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), FTLD-ALS y/o ataxia espinocerebelar tipo 36, y los síntomas asociados en las mismas.

Debido a que los anticuerpos de la presente invención han

demostrado ser capaces de unirse a las DPRs, en particular C9ORF72-DPRs en secciones de tejido de pacientes con FTLD, véase por ejemplo el Ejemplo 12 y las figuras 14A-14C, los anticuerpos derivados de humano y derivados biotecnológicos de los mismos son útiles tanto en el tratamiento como en la diagnosis de FTLD y otras enfermedades y/o trastornos asociados con las DPRs y síntomas de las mismas. En particular, el potencial terapéutico in vitro e in vivo de los anticuerpos de la presente invención para modular el avance de la enfermedad se evalúa ya sea en modelos basados en células o en modelos de ratón de expansión de repetición de hexanucleótido C9orf72 seleccionados, respectivamente; Véase, por ejemplo, los Ejemplos 14 y 15.

Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención, las moléculas de unión que tienen sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, los polinucleótidos, los vectores o las células de la presente invención se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades asociadas con DPRs, para monitorear el avance de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento, y para la diagnosis de enfermedades asociadas con la amiloidosis de DPRs que

comprende degeneración frontotemporal lobular (FTLD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), y/o ataxia espinocerebelar tipo 36.

Como se muestra en los Ejemplos 12 y 13, así como en las figuras 14A-14C y 15, los anticuerpos de la presente invención se unen a agregados de C9ORF72-proteína de repetición de dipéptido patológicos en pacientes con FTLD. Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención, los anticuerpos, moléculas de unión que tienen sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, los polinucleótidos, los vectores o las células de la presente invención se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades asociadas con las C9ORF72-DPRs, para monitorear el avance de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento, y para la diagnosis de enfermedades asociadas con agregados de C9ORF72-DPRs que comprenden degeneración frontotemporal lobular (FTLD), esclerosis lateral amiotrófica, y/o FTLD-ALS, y los síntomas asociados con las mismas.

Tratamiento

Tal como se utilizan en la presente solicitud, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento

terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o desacelerar (aminorar) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, tal como el desarrollo de deficiencia cardiaca. Los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, retraso o desaceleración del avance de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la condición o el trastorno, así como aquellos propensos a padecer la condición o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la manifestación de la condición o trastorno.

Si no se indica lo contrario, el término “fármaco”, “medicina” o “medicamento” se utilizan de manera intercambiable en la presente solicitud e incluirán pero no se limitan a todos (A) los artículos, medicinas y preparaciones para uso interno o externo y cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a ser utilizadas para la diagnosis, curación, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad

de humano o de otros animales; y (B) artículos, medicinas y preparaciones (distintos de los alimentos) destinados a afectar la estructura o cualquier función del cuerpo del humano u otros animales; y (C) artículos destinados a ser utilizados como un componente de cualquier artículo especificado en las cláusulas (A) y (B). El término “fármaco”, “medicina” o “medicamento” debe incluir la fórmula completa de la preparación destinada a ser utilizada ya sea en humanos u otros animales que contenga uno o más “agentes”, “compuestos”, “sustancias” o “composiciones (químicos) como también en algún otro contexto otros excipientes farmacéuticamente inactivos tales como materiales de relleno, desintegrantes, lubricantes, agentes de deslizamiento, aglutinantes o que aseguran transporte, desintegración, desagregación, disolución y disponibilidad biológica fácil del “fármaco”, “medicina” o “medicamento” en un sitio objetivo pretendido dentro del cuerpo del humano u otros animales, por ejemplo, en la piel, en el estómago o el intestino. Los términos “agente”, “compuesto” o “sustancia” se utilizan de manera intercambiable en la presente solicitud e incluyen, en un contexto más particular, pero no se limitan a todos los agentes farmacológicamente activos, es decir, agentes que inducen un efecto biológico o farmacológico deseado o que son investigados o analizados respecto a la capacidad de inducir

dicho posible efecto farmacológico mediante los métodos de la presente invención.

Con “individuo” o “animal” o “paciente” o “mamífero” se quiere decir cualquier individuo, particularmente un individuo mamífero, por ejemplo un paciente humano, para quien se desea la diagnosis, prognosis, prevención o terapia.

Vehículos farmacéuticos

Los vehículos farmacéuticamente aceptables y las vías de administración se pueden tomar a partir de la literatura correspondiente conocida por el experto en la técnica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular de conformidad con métodos bien conocidos en la técnica; Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) por the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols 2ª edición de Robinson et al., Humana Press, Totowa, New Jersey, EE.UU., 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2ª edición de Taylor y Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos apropiados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes

humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular mediante métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al individuo a una dosis apropiada. La administración de las composiciones apropiadas se puede efectuar de diferentes maneras. Los ejemplos incluyen administrar una composición que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable a través de métodos orales, intranasales, rectales, tópicos, intraperitoneales, intravenososos, intramusculares, subcutáneos, subdérmicos, transdérmicos, intratecales e intracraneales. Las formulaciones en aerosol tales como formulaciones de aspersión nasal incluyen soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo con agentes conservadores y agentes isotónicos. Dichas formulaciones de preferencia se ajustan a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Las composiciones farmacéuticas para administración oral, tales como moléculas de anticuerpo de dominio individual (por ejemplo, “nanocuerpos^{MR}”), etc. también son contempladas en la presente invención. Dichas formulaciones orales pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo, líquida o semisólida. Una tableta puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las formulaciones para administración

rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio con un vehículo adecuado; Véase también O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735. Los lineamientos adicionales con respecto a formulaciones que sean apropiadas para diversos tipos de administración se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17a ed. (1985) y actualizaciones correspondientes. Para una revisión breve de los métodos para el suministro de fármacos véase Langer, Science 249 (1990), 1527-1533.

II. Anticuerpos de la presente invención

La presente invención se refiere en general a anticuerpos anti-DPR, de preferencia anticuerpos anti-C9ORF72-DPR derivados de humano y fragmentos de unión a antígeno, así como a derivados biotecnológicos de los mismos los cuales de preferencia demuestran las características de unión inmunológica y/o las propiedades biológicas como se ha delineado para los anticuerpos ilustrados en los Ejemplos. De conformidad con la presente invención, se clonan anticuerpos monoclonales de humano específicos para DPRs de un combinado de individuos humanos sanos. Sin embargo, en otra modalidad de la presente invención, los anticuerpos anti-DPR

monoclonales de humano también podrían clonarse a partir de pacientes que muestran síntomas de una enfermedad y/o trastorno asociado con la agregación de DPR.

En el transcurso de los experimentos realizados de conformidad con la presente invención, los anticuerpos de IgG recombinantes derivados a partir de anticuerpos presentes en los medios acondicionados de células B de memoria humanas cultivadas inicialmente tamizadas para unión a DPR se evaluaron respecto a su capacidad de unirse a DPRs y a otras proteínas incluyendo seroalbúmina de bovino (BSA); Véanse los Ejemplos 3 a 7 así como las figuras 2A-2M a 6A-6C. Solamente se seleccionan los sobrenadantes de células B capaces de unirse a la proteína de DPR pero no a ninguna de las otras proteínas en el tamizado para análisis adicionales, incluyendo la determinación de la clase del anticuerpo y la subclase de la cadena ligera. Las células B seleccionadas se procesan después para clonación del anticuerpo; Véanse Ejemplos 1 y 12 así como las figuras 14A-14C.

En breve, el método de clonación consiste en la extracción de moléculas de ARN mensajero a partir de las células B seleccionadas, retrotranscripción mediante RT-PCR, amplificación de las regiones codificadoras de anticuerpo mediante PCR, clonación en vectores de plásmido y

secuenciación. Los anticuerpos humanos seleccionados se producen después mediante expresión recombinante en células HEK293 o CHO y purificación, y posteriormente se caracterizan respecto a su capacidad para unirse a la proteína de DPR de humano. La combinación de diversas pruebas, por ejemplo expresión recombinante de los anticuerpos en células HEK293 o CHO y la posterior caracterización de sus especificidades de unión hacia la proteína de DPR de humano, y su unión distintiva a formas patológicamente mutadas y/o agregadas de los mismos confirma que por primera vez se han clonado anticuerpos humanos que son altamente específicos para DPR y distintivamente reconocen y se unen selectivamente a las formas patológicamente agregadas de la proteína de DPR, por ejemplo C9ORF72-DPRs. En algunos casos, también se generan anticuerpos quiméricos de ratón tomando como base los dominios variables de los anticuerpos de humano de la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención se refiere en general a anticuerpos anti-DPR monoclonales recombinantes derivados de humano y a fragmentos de unión a DPR, derivados sintéticos y biotecnológicos y variantes de los mismos. En una modalidad de la invención, el anticuerpo es capaz de unirse a las C9ORF72-DPRs de humano.

En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo se une a una proteína o péptido de DPR, en la cual el número de repetición es de aproximadamente 10 a 20, de preferencia 15 tal como se utiliza en los Ejemplos para la repetición GA, GP, GR, PR y PA de C9ORF72; véase, por ejemplo, Ejemplos 8 y 9, así como las figuras 7A-7P y 8A-8F. La proteína de DPR puede consistir esencialmente de la DPR solamente o comprender la DPR dentro de un polipéptido más grande, por ejemplo en el extremo N-terminal, C-terminal o entre los mismos como la repetición GA o GP en el exón 1 en C9ORF72.

Asimismo, como se demuestra en los Ejemplos 12 y 13 y se muestra en las figuras 14A-14C y en la figura 15, los anticuerpos anti-DPR monoclonales derivados de humano NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 y NI-308.4M1 de la presente invención se caracterizan de preferencia porque se unen específicamente a las C9ORF72-DPRs mutadas y/o agregadas patológicas y porque no reconocen sustancialmente C9ORF72 en la forma fisiológica; véase, por ejemplo, figuras 14A-14C y figura 15. Por lo tanto, la presente invención provee un conjunto de anticuerpos anti-DPR de humano con propiedades de unión particularmente útiles para propósitos de diagnóstico y terapéuticos. Por tanto, en una modalidad la presente invención provee anticuerpos que son capaces de

unirse específicamente a las formas patológicamente agregadas de las proteínas de DRP, por ejemplo, C9ORF72-DPRs.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención exhibe las propiedades de unión de cualquiera de los anticuerpos de ejemplo NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI.308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10, tal como se describe en los Ejemplos. El anticuerpo anti-DPR de la presente invención reconoce de manera preferente C9ORF72 alterada patológicamente, tal como especies de C9ORF72-DPR y sus fragmentos en lugar de C9ORF72 fisiológica. Por lo tanto, en una modalidad, el anticuerpo de la presente invención no reconoce sustancialmente las especies de C9ORF72 fisiológica.

El término “no reconoce sustancialmente” cuando se utiliza en la presente solicitud para describir la afinidad de unión de una molécula de un grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento del mismo o una molécula de unión para una molécula objetivo específica, antígeno y/o conformación de la molécula objetivo y/o antígeno significa que la molécula del grupo antes mencionado se une a dicha molécula, antígeno y/o conformación con una afinidad de unión la cual es por lo menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces o 9 veces

menor que la afinidad de unión de la molécula del grupo antes mencionado para unirse a otra molécula, antígeno y/o conformación. De manera muy frecuente la constante de disociación (KD) se utiliza como una medida de la afinidad de unión. Algunas veces es la CE_{50} en una prueba específica como por ejemplo una prueba ELISA la que se utiliza como una medida de la afinidad de unión. De preferencia, el término “no reconoce sustancialmente” cuando se utiliza en la presente solicitud significa que la molécula del grupo antes mencionado se une a dicha molécula, antígeno y/o conformación con una afinidad de unión que es por lo menos o 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces o 10000 veces menor que la afinidad de unión de dicha molécula del grupo antes mencionado para unirse a otra molécula, antígeno y/o conformación.

Como se describió anteriormente, se demostró que la causa genética más común de la agregación de C9ORF72 en FTLD y ALS se debe a una repetición de hexanucleótido expandida heterocigota (GGGGCC) localizada entre los exones no codificadores 1a y 1b del gen de C9ORF72. En particular, se mostró que esta traducción no convencional tipo no ATG de la transcripción sentido en los tres marcos de lectura alternados, es decir, de las repeticiones de hexanucleótido expandido, da como resultado la producción, generación y agregación de

diferentes polipéptidos, comprendiendo cada uno unidades repetitivas de dos aminoácidos (repeticiones de dipéptido, DPRs), es decir poli-(Gly-Ala, GA), poli-(Gly-Pro, GP) y/o poli-(Gly-Arg, GR). Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención, la DPR comprende las repeticiones poli-glicina-alanina (Gly-Ala, GA), poli-glicina-prolina (Gly-Pro; GP) o poli-glicina-arginina). En una modalidad preferida, la DPR consiste de repeticiones de poli-glicina-alanina (Gly-Ala; GA) o de poli-glicina-prolina (Gly-Pro; GP).

A pesar del hecho que la repetición de hexanucleótido expandida está localizada entre los exones no codificadores 1a y 1b de C9ORF72, y del hecho de que la C9ORF72 mutada carece de un codón de inicio, todos los marcos de lectura se traducen como las proteínas de repetición de dipéptido (DPR), es decir poli-(Gly-Ala; GA), poli-(Gly-Pro; GP), y/o poli-(Gly-Arg; GR). Los estudios preliminares también muestran que los anticuerpos han sido identificados y clonados en los experimentos realizados de conformidad con la presente invención no sólo tiñen las inclusiones citoplasmáticas neuronales, inclusiones intranucleares neuronales, y neuritis distrófica en la capa de célula granular del cerebelo asociada con C9ORF72-DPRs de GA, GP o tipo GP, es decir traducidas en la dirección de cadena sentido (DPRs sentido), como se

muestra en los Ejemplos 12 y 13 así como en las figuras 14A-14C y en la figura 15, sino también anticuerpos que son capaces de reconocer DPRs traducidas en forma bidireccional, es decir proteínas de repetición de dipéptido que son traducidas en su dirección antisentido, es decir poli-(Pro-Arg; PR), y/o poli-(Pro-Ala, PA). Por consiguiente, se proveen anticuerpos que son capaces de identificar y unirse a la agregación de los productos de la proteína C9ORF72 derivadas de ambas cadenas, es decir DPRs que resultan de la repetición de hexanucleótido expandida de la región no codificadora entre los exones 1a y 1b de C9ORF72 traducidas en dirección sentido y antisentido. Por lo tanto, en una modalidad, los anticuerpos anti-DPR, moléculas de unión a DPR o fragmentos, variantes sintéticas, o biotecnológicas de los mismos reconocen las DPRs tal como son traducidas a partir del gen de C9ORF72 en su dirección sentido y/o antisentido. En una modalidad preferida, los anticuerpos de DPR reconocen las DPRs de tipo poli-(Gly-Ala; GA), poli-(Gly-Pro; GP), poli-(Gly-Arg; GR), poli-(Pro-Arg; PR), y/o poli-(Pro-Ala, PA).

Además, en experimentos preliminares se identificaron anticuerpos de DPR que pueden unirse a diferentes constelaciones de DPRs, es decir, diferentes composiciones de aminoácido de las proteínas de DPR. En particular, se

observaron anticuerpos de DPR que reconocen proteínas de DPR que consisten tanto de $(PA)_n$ como de $(GA)_n$, $(GP)_n$ y $(GA)_n$, $(PR)_n$ y $(GA)_n$, o $(GR)_n$ y $(GA)_n$ y $(PR)_n$. Por consiguiente, en una modalidad de la presente invención, el anticuerpo de DPR puede reconocer proteínas de DPR que consisten de una combinación de proteínas de DPR que muestran una composición de aminoácido diferente. Por lo tanto, como se demuestra en los Ejemplos y se muestra en las figuras 2A a 2M y 7A a 7P se obtienen anticuerpos derivados de humano que reconocen dos o incluso tres repeticiones de dipéptido diferentes con una especificidad en el mismo orden de magnitud. En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-DPR puede reconocer proteínas de DPR que consisten de una combinación de proteínas de DPR, en la cual las proteínas de DPR son $(PA)_n$ o $(GA)_n$, $(GP)_n$ o $(GA)_n$, $(PR)_n$ o $(GA)_n$, o $(GR)_n$ o $(GA)_n$ o $(PR)_n$, es decir, el anticuerpo anti-DPR de la presente invención puede reconocer cualquier combinación de DPRs, de preferencia $(GP)_n$ y $(GA)_n$ como se muestra para el anticuerpo NI-308.5G2 (véase figuras 2A y 2G y figuras 7A, 7B, 7J y 7K) o $(GR)_n$, $(GA)_n$ y $(PR)_n$ como se muestra para el anticuerpo NI-308.6B11 (véase figuras 2A y 2I y figuras 7A, 7C, 7L y 7M) o $(PA)_n$ y $(GA)_n$ como se muestra para el anticuerpo NI-308.4M1 (véase figuras 2A y 2K y figuras 7E y 7P) o (PR)n y (GA)n como se muestra para el anticuerpo NI-

308.16C10 (véase figuras 2A y 2M).

De manera alternativa, o además, el anticuerpo de la presente invención se puede diseñar para que comprenda por lo menos un primer y un segundo sitio de unión a antígeno, es decir, dominio variable de dos anticuerpos diferentes de la presente invención con epítopes distintos, de preferencia en el cual una o ambas regiones variables se derivan a partir de cualquiera de los presentes anticuerpos ilustrados en los Ejemplos y Figuras anexos, y como se describe también en la presente solicitud. Por ejemplo, la combinación de la región variable de los anticuerpos NI-308.6B11 y NI-308.4M1 daría como resultado un anticuerpo capaz de unirse a una combinación de DPRs que consiste de $(GA)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ y $(PA)_n$. Por lo tanto, los presentes anticuerpos permiten la provisión de anticuerpos capaces de reconocer cualquier combinación de DPRs. Los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos se pueden generar mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante recombinación química de fragmentos de inmunoglobulina G1 monoclonales como es descrito, por ejemplo, por Brennan *et al.*, Science. 229 (1985), 81-83, o co-expresión recombinante simultáneamente de la cadena pesada y ligera apropiada y apareamiento correspondiente; véase, por ejemplo, Lewis *et al.*, Nature

Biotechnology 32 (2014), 191-198; para revisión véase, por ejemplo, Kontermann, mAbs 4 (2012), 182-197 y Kontermann y Brinkmann, Drug Discovery Today 20 (2015), 838-847.

En varios estudios se ha demostrado que la agregación de las DPRs en los pacientes ocurre principalmente en pacientes con un número más altos de repeticiones de dipéptido. Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención, las moléculas de unión a DPR se unen a las proteínas de DPR que contienen números más altos de repeticiones, es decir DPRs que consisten de $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$, o $(PA)_n$. Aquí la n denota el número de repeticiones, por ejemplo, una proteína de DPR con 15 repeticiones será denotada $(XX)_{15}$, significando también que, por ejemplo, la expansión de hexanucleótido G_4C_2 se repite 15 veces. En una modalidad preferida el número de repetición es 10 a 30 $(XX')_{10-30}$. En una modalidad particular preferida el número de repetición es $(XX')_{15}$.

Sin embargo, sin estar limitado a la teoría, un tamaño de repetición más pequeña, es decir < 15 repeticiones, de preferencia < 10 repeticiones, de manera más preferida < 5 repeticiones, podría imitar péptidos más grandes después de revestimiento denso en una superficie. Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención, los anticuerpos de DPR se unen a las DPRs que consisten de $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$, o

$(PA)_n$, en las cuales el número de repeticiones (n) es menor de 5 repeticiones. Los experimentos preliminares muestran que una unión de anticuerpos de DPR de la presente invención también es posible para proteínas de DPR que muestran sólo 3 a 4 repeticiones; véase, por ejemplo, figuras 7A-7P. Por consiguiente, en una modalidad de la presente invención 3 a 4 repeticiones son suficientes para una unión del anticuerpo de DPR. En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención no se une sustancialmente o según es sólo hasta un grado significativamente menor a un epítope con menos de 3 de cualquiera de las repeticiones de dipéptido descritas anteriormente (n <3); véase, por ejemplo, Ejemplos 8:09 así como las figuras 7A-7P y las figuras 8A-8F.

Como se muestra en los Ejemplos, en particular en los Ejemplos 3 y 4, se diseñan diferentes construcciones de DPR que muestran un número más alto de repeticiones de dipéptido. En particular se construyen construcciones de DPR que muestran 15 repeticiones, es decir $(GA)_{15}$, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ y $(PR)_{15}$. Utilizando estas construcciones se realizan estudios de caracterización de los anticuerpos identificados de conformidad con la presente invención; véase, por ejemplo, Ejemplo 3 y 4. Los resultados revelan que los anticuerpos NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1 y NI-308.45C2 se unen

específicamente con afinidad alta a C9ORF72-DPR $(GA)_{15}$, pero no a las DPRs que consisten de $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ o $(PR)_{15}$; véase, por ejemplo figuras 2A, 2B, 2C, 2D y 2E así como las figuras 3A, 3B, 3C, 3D y 3E. En contraste, los anticuerpos NI-308.5G2, NI-308.12A3 y NI-308.46E9 reconocen específicamente con afinidad alta la C9ORF72-DPR $(GA)_{15}$ y $(GP)_{15}$, pero no las DPRs que consisten de $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ o $(PR)_{15}$; véase, por ejemplo figuras 2A, 2G, 2H y 2L, y las figuras 3A, 3G, 3H y 3L. El anticuerpo NI-308.24E11 reconoce la C9ORF72-DPR $(PR)_{15}$ solamente, pero no las DPRs que consisten de $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(GA)_{15}$ o $(PA)_{15}$; véase, por ejemplo figuras 2A y 2F así como también las figuras 3A y 3F. En contraste, el anticuerpo NI-308.16C10 reconoce de manera preferente la C9ORF72-DPR $(PR)_{15}$ y también unida a $(GA)_{15}$ pero no las DPRs que consisten de $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$ o $(PR)_{15}$; véase figuras 2A y 2M así como también las figuras 3A y 3M. De manera sorpresiva, los anticuerpos NI-308.6B11 y NI.308.46F8 muestran una afinidad alta para $(GR)_{15}$, $(GA)_{15}$ y $(PR)_{15}$, pero no la DPR que consiste de $(GP)_{15}$ o $(PA)_{15}$; véase, por ejemplo, figuras 2A, 2I, y 2J así como las figuras 3A, 3I y 3J. El anticuerpo NI-308.4M1 reconoce la C9ORF72-DPR $(PA)_{15}$ y $(GA)_{15}$, pero no las DPRs que consisten de $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, o $(PR)_{15}$; véase, por ejemplo figuras 2A y 2K así como también las figuras 3A y 3K. Por lo

tanto, en una modalidad, el anticuerpo de la presente invención de preferencia reconoce una proteína de DPR que consiste de $(GA)_{15}$. En otra modalidad, el anticuerpo de la presente invención que reconoce una proteína de DPR que consiste de $(GA)_{15}$ no reconoce sustancialmente una proteína de DPR que consiste de $(GP)_{15}$ o $(GR)_{15}$ o $(PA)_{15}$ o $(PR)_{15}$. En una modalidad adicional, el anticuerpo de la presente invención de preferencia reconoce una proteína de DPR que consiste de $(GP)_{15}$ o $(GA)_{15}$, de preferencia el anticuerpo que reconoce una proteína de DPR que consiste de $(GP)_{15}$ o $(GA)_{15}$ no reconoce sustancialmente una proteína de DPR que consiste de $(GR)_{15}$ o $(PR)_{15}$ o $(PA)_{15}$. En una modalidad adicional, el anticuerpo de la presente invención que reconoce una proteína de DPR que consiste de $(PR)_{15}$ no reconoce sustancialmente una proteína de DPR que consiste de $(GA)_{15}$, $(GP)_{15}$ o $(GR)_{15}$ o $(PA)_{15}$. Incluso en una modalidad adicional, el anticuerpo de la presente invención que reconoce una proteína de DPR que consiste de $(GA)_{15}$, $(GR)_{15}$ o $(PR)_{15}$ no reconoce sustancialmente una proteína de DPR que consiste de $(GP)_{15}$ o $(PA)_{15}$. En una modalidad adicional, el anticuerpo de la presente invención de preferencia reconoce una proteína de DPR que consiste de $(PA)_{15}$ o $(GA)_{15}$, de preferencia el anticuerpo que reconoce una proteína de DPR que consiste de $(PA)_{15}$ o $(GA)_{15}$ no reconoce sustancialmente una proteína de

DPR que consiste de $(GP)_{15}$ o $(GR)_{15}$ o $(PR)_{15}$. Incluso en una modalidad adicional, el anticuerpo de la presente invención de preferencia reconoce una proteína de DPR que consiste de $(GA)_{15}$ o $(PR)_{15}$, de preferencia el anticuerpo que reconoce una proteína de DPR que consiste de $(PR)_{15}$ o $(GA)_{15}$ no reconoce sustancialmente una proteína de DPR que consiste de $(GP)_{15}$ o $(GR)_{15}$ o $(RA)_{15}$. Dicho en otras palabras, los anticuerpos en dichas modalidades son capaces de unirse ya sea a una proteína de DPR individual o por lo menos a dos proteínas de DPR diferentes, véase, por ejemplo, los anticuerpos de ejemplo NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI.308-16C10 como se ilustran en los ejemplos 3 y 4 así como en las figuras 2A-2M y las figuras 3A-3M.

Utilizando las construcciones como las descritas en los Ejemplos, se podría mostrar que el anticuerpo anti-DPR de la presente invención se une a las C9ORF72-DPRs $(GA)_{15}$ o $(GP)_{15}$, o $(GR)_{15}$, o $(PR)_{15}$, o $(PA)_{15}$ de humano. En este contexto, las afinidades de unión de cualquiera de los anticuerpos anti-DPR de la presente invención o derivado biotecnológico del mismo puede estar en el intervalo como se muestra para los anticuerpos de ejemplo NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-

308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10 en las figuras 2A-2M, es decir que tienen las mitades de la concentración efectiva máxima (CE_{50}) de aproximadamente 0.1 nM a 200 nM, de preferencia 1 pM a 100 nM, de manera más preferida una CE_{50} de aproximadamente 50 pM a 50 nM, de manera más preferida una CE_{50} de aproximadamente 0.1 nM a 0.5 nM para las construcciones BSA-$(GA)_{15}$, BSA-$(GP)_{15}$ o BSA-$(PA)_{15}$ y más preferido aún una CE_{50} de aproximadamente 10 nM a 200 nM para las construcciones BSA-$(PR)_{15}$; véase, por ejemplo, figuras 3A-M.

De preferencia, el anticuerpo anti-DPR, fragmento de unión a DPR o derivado biotecnológico del mismo tiene una afinidad de unión correspondiente a un valor de CE_{50} (mitad de la concentración efectiva máxima) de > 200 nM, de preferencia ≤ 100 nM, de manera más preferida ≤ 50 nM, de manera incluso más preferida ≤ 10 nM y más preferido aún ≤ 0.5 nM para unión a la proteína de DPR $(GA)_{15}$, $(GR)_{15}$ o $(PR)_{15}$, o ≤ 10 nM, de preferencia ≤ 2 nM, de manera incluso más preferida ≤ 1 nM y más preferido aún ≤ 0.5 nM para unión a la proteína de DPR $(GP)_{15}$ o $(PA)_{15}$; véase, por ejemplo Figs. 2A-M.

Algunos anticuerpos son capaces de unirse a una amplia gama de biomoléculas, por ejemplo, proteínas. Como

comprenderá el experto en la técnica, el término específico se utiliza aquí para indicar que otras biomoléculas que DPR no se unen significativamente a la molécula de unión a antígeno, por ejemplo, uno de los anticuerpos de la presente invención. De preferencia, el nivel de unión a una biomolécula distinta de las DPRs da como resultado una afinidad de unión que es como máximo de sólo 20% o menos, 10% o menos, sólo 5% o menos, solamente 2% o menos o solo 1% o menos (es decir, por lo menos 5, 10, 20, 50 o 100 veces más baja, o cualquier cosa más allá) de la afinidad a DPRs, respectivamente; véanse, por ejemplo, Ejemplos 3 a 5 así como las figuras 2A-2M a figuras 4A-4I.

En una modalidad, el anticuerpo anti-DPR de la presente invención se une de manera preferente a las formas agregadas de las DPRs, por ejemplo C9ORF72-DPR y/o fragmentos, derivados, fibrillas y/u oligómeros de las mismas. En otra modalidad, el anticuerpo anti-DPR de la presente invención de preferencia se une tanto a C9ORF72-DPRs no asociadas con una enfermedad y/o trastorno como a las formas patológicamente agregadas de C9ORF72-DPR; véase, por ejemplo, Ejemplo 10 así como las figuras 9 a 12A-12B. Incluso en otra modalidad, el anticuerpo anti-DPR de la presente invención es capaz de unirse a las formas de DPRs, por ejemplo

C9ORF72-DPR y/o fragmentos, derivados, fibrillas y/u oligómeros de las mismas en solución; véase Ejemplo 7 así como las figuras 6A-6C. En este contexto, cualquiera de los anticuerpos anti-DPR de la presente invención o derivado biotecnológico de los mismos puede ser capaz de capturar péptidos de proteína de DPR poli-GA en solución como se muestra para los anticuerpos de ejemplo NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.45C2 y NI-308.28G1 o cualquiera de los anticuerpos anti-DPR de la presente invención o derivado biotecnológico de los mismos puede ser capaz de precipitar poli-PR y poli-GR como se muestra para los anticuerpos de ejemplo NI-308.24E11 y NI-308.6B11; véase, por ejemplo, figura 6(A) a figura 6(C).

En las figuras 14A-14C y en la figura 15, así como en los Ejemplos 12 y 13, se demuestra que los anticuerpos de la presente invención son capaces de teñir inclusiones citoplasmáticas neuronales patológicas, inclusiones intranucleares neuronales y neuritas distróficas en la capa de células granulares del cerebelo en pacientes con FTLD las cuales están asociadas con agregados de DPRs, en particular proteínas de C9ORF72-DPRs. Por lo tanto, en una modalidad, el anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse a C9ORF72 agregada en tejido humano. En una modalidad

preferida particular, el anticuerpo es capaz de unirse a C9ORF72 agregada en tejido de FTLD de humano. Como se mencionó, C9ORF72 agregada significa C9ORF72 mutada que muestra como se describió anteriormente una repetición de hexanucleótido expandida en su región no codificadora. Esta repetición conduce a una pérdida del lado de inicio de ATG y a una traducción de las repeticiones como DPRs como se ha descrito anteriormente.

Como se mencionó antes, la acumulación de agregados de proteína de DPR en el lóbulo frontal y lóbulo temporal del cerebro es una marca característica del trastorno neurodegenerativo FTLD. Los pacientes con agregados de DPR en las inclusiones citoplasmáticas neuronales, inclusiones intranucleares neuronales y neuritas distróficas en la capa de célula granular del cerebelo, como se muestra en las figuras 14A-14C y figura 15 así como en los ejemplos 12 y 13 de la presente invención, con frecuencia muestran una función cognitiva alterada. En particular, los pacientes con FTLD muestran demencia, cambios del comportamiento así como de la personalidad, disfunciones del lenguaje, y/o psicosis que se deben a la degeneración de la corteza frontal y temporal, como se describió supra. Por lo tanto, en una modalidad el anticuerpo de la presente invención es útil para el tratamiento de

enfermedades y/o trastornos asociados con DPRs seguido en una modalidad preferida, el anticuerpo de la presente invención es útil en el tratamiento de FTLD y de los síntomas de la misma.

La presente invención también está dirigida a un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, variantes biotecnológicas y derivados del mismo, en los cuales el anticuerpo comprende un dominio de unión a antígeno idéntico a aquel de un anticuerpo seleccionado a partir del grupo que consiste de NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10 o es capaz de competir con cualquiera o con todos los anticuerpos por la unión a DPR, por ejemplo $(GA)_{15}$ o $(GP)_{15}$ o $(GR)_{15}$ o $(PR)_{15}$ o $(PA)_{15}$.

La presente invención ejemplifica adicionalmente varias moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, que reconocen las DPRs, los cuales se pueden caracterizar porque comprenden en su región variable, por ejemplo, dominio de unión por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la región variable V_H y/o V_L que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácido representadas en cualquiera de las figuras 1A-1L.

Las secuencias de nucleótido correspondientes que

codifican para las regiones variables identificadas anteriormente se indican en la Tabla II más adelante. Los ejemplos de conjuntos de CDR de las secuencias de aminoácido anteriores de la región V_H y/o V_L están representadas en cualquiera de las figuras 1A-1L. Sin embargo, como se discute en lo que sigue, el experto en la técnica está bien consciente del hecho de que, además o alternativamente, se pueden usar CDRs, las cuales difieren en su secuencia de aminoácido de aquellas indicadas en cualquiera de las figuras 1A-1L en uno, dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3. Por lo tanto, en una modalidad, se provee el anticuerpo de la presente invención, derivado biotecnológico o un fragmento de unión a DPR del mismo que comprende en su región variable por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) como se representa en cualquiera de las figuras 1A-1L y/o una o más CDR de las mismas que comprenden una o más sustituciones de aminoácido.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención es cualquiera de los anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácido de la región V_H y/o V_L como se representa en cualquiera de las figuras 1A-1L o una región V_H y/o V_L de la misma que comprende una o más sustituciones de aminoácido. De preferencia, el anticuerpo de la presente invención se

caracteriza por la preservación del apareamiento cognado de la cadena pesada y la cadena ligera como está presente en la célula B de humano. En una modalidad adicional de la presente invención, el anticuerpo anti-DPR, fragmento de unión a DPR, variante sintética o biotecnológica del mismo se puede optimizar para que tenga afinidad de unión apropiada para el objetivo y propiedades farmacocinéticas y de estabilidad. Por lo tanto, por lo menos un aminoácido en la CDR o región variable, el cual es propenso a modificaciones que se seleccionan a partir del grupo que consiste de glucosilación, oxidación, desaminación, corte de enlace peptídico, formación de isoaspartato y/o cisteína no apareada, se sustituye con un aminoácido que carece de dicha alteración o en el cual se elimina o se añade químicamente o enzimáticamente por lo menos una porción carbohidrato al anticuerpo, véase, por ejemplo, Liu *et al*., J. Pharm. Sci. 97 (7) (2008), 2426-2447; Beck *et al*., Nat. Rev. Immunol. 10 (2010), 345-352; Haberger *et al*., MAbs. 6 (2014), 327-339.

De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, derivado biotecnológico o variante del mismo, el cual compite por la unión a DPRs con por lo menos uno de los anticuerpos que tienen la región V_H y/o V_L como se representa en cualquiera de Las figuras 1A-1L.

Los resultados experimentales provistos en las figuras 4A-4I y el Ejemplo 5 sugieren que algunos de los anticuerpos anti-DPR de la presente invención se unen de manera preferente a las formas agregadas de DPRs que causan la enfermedad tales como C9ORF72-DPRs sobre las otras proteínas formadoras de amiloide. Por consiguiente, en una modalidad el anticuerpo de la presente invención reconoce de manera preferente las C9ORF72-DPRs sobre las proteínas formadoras de amiloide.

En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo anti-DPR, fragmento de unión a DPR, derivado sintético o biotecnológico del mismo reconoce de manera preferente formas mutadas y/o agregadas de C9ORF72-DPR sobre C9ORF72 fisiológica.

El anticuerpo de la presente invención puede ser derivado de humano, en particular para aplicaciones terapéuticas. De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de roedor, rodentizado o quimérico de roedor-humano, de preferencia un anticuerpo de múrido, murinizado o quimérico de múrido-humano o un anticuerpo de rata, ratinizado o quimérico de rata-humano el cual es particularmente útil para métodos de diagnóstico y estudios en animales. En una modalidad el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo quimérico de roedor-humano o un anticuerpo

rodentizado.

Asimismo, en una modalidad, el anticuerpo quimérico de la presente invención, es decir, que comprende los dominios variables de un anticuerpo de humano y dominios constantes ligeros y pesados de múrido genéricos, se unen con una alta afinidad a las DPRs de humano. De preferencia, la afinidad de unión de anticuerpos quiméricos es similar a sus contrapartes derivadas de humano.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención se provee mediante cultivos de células B individuales u oligoclonales que se cultivan y el sobrenadante del cultivo que contiene los anticuerpos producidos por dichas células B, se tamiza respecto a la presencia y afinidad de anticuerpos anti-DPR en el mismo. El proceso de tamizado comprende tamizar respecto a la unión a agregados monoméricos, fibrilares o no fibrilares nativos como los oligómeros de hDPRs derivados de un péptido sintético de hDPR de longitud completa o por ejemplo purificado a partir de plasma humano o expresión recombinante. Los péptidos de hDPR respectivos se pueden utilizar en su forma pura o de manera alternativa copulados o conjugados a un vehículo adecuado tal como BSA.

En una modalidad preferida la presente invención también se extiende en términos generales a anticuerpos anti-DPR y

moléculas de unión a DPR que compiten con los anticuerpos monoclonales de humano de la presente invención por la unión específica a las especies mutadas y/o agregadas de C9ORF72-DPR o fragmentos de las mismas.

La competición entre anticuerpos se determina mediante una prueba en la cual la inmunoglobulina bajo prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como las DPRs. Se conocen numerosos tipos de pruebas de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo con enzima (EIA) directo o indirecto en fase sólida, prueba de competición en emparedado; véase Stahli *et al.*, Methods in Enzymology 9 (1983), 242-253; EIA con biotina-avidina directo en fase sólida; véase Kirkland *et al.*, J. Immunol. 137 (1986), 3614-3619 y Cheung *et al.*, Virology 176 (1990), 546-552; prueba marcada directa en fase sólida, prueba en emparedado marcada directa en fase sólida; véase Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA con marca, directa en fase sólida utilizando marca de I^{125}; véase Morel *et al.*, Molec. Immunol. 25 (1988), 7-15 y Moldenhauer *et al.*, Scand. J. Immunol. 32 (1990), 77-82. Típicamente, dicha prueba implica el uso de DPRs purificadas o C9ORF72-DPRs mutadas y/o agregadas, tales como oligómeros

y/o fibrillas de las mismas unidas a una superficie sólida o a células que llevan cualquiera de éstas, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada, es decir el anticuerpo monoclonal derivado de humano de la presente invención. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. De preferencia, la prueba de unión competitiva se realiza bajo condiciones como las descritas para la prueba ELISA en los ejemplos anexados. Los anticuerpos identificados mediante prueba de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítope que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítope adyacente lo suficientemente proximal al epítope unido por el anticuerpo de referencia para que ocurra el impedimento estérico. Usualmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, éste va a inhibir la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en por lo menos 50% o 75%. Por lo tanto, la presente invención también está dirigida a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el cual el anticuerpo inhibe de manera competitiva un anticuerpo de referencia que se

selecciona a partir del grupo que consiste de NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10 de que se una a las DPRs.

La presente invención también está dirigida a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el cual el anticuerpo inhibe de manera competitiva a un anticuerpo de referencia que se selecciona a partir del grupo que consiste de NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10 de unirse a las especies mutadas y/o agregadas de C9ORF72-DPR o fragmentos de la misma.

En otra modalidad, la presente invención provee un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), en la cual por lo menos una de las V_H-CDRs de la región variable de la cadena pesada o por lo menos dos de las V_H-CDRs de la región variable de la cadena pesada son por lo menos 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las secuencias de aminoácido de V_H-CDR1, V_H-CDR2 o V_H-CDR3 de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. De manera alternativa, las regiones V_H-

CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 de la V_H son por lo menos 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las secuencias de aminoácido de V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. Por lo tanto, de conformidad con ésta modalidad una región variable de la cadena pesada de la invención tiene secuencias de polipéptido de V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 relacionadas con los grupos mostrados en cualquiera de las figuras 1A-1L respectivamente. Aunque las figuras 1A-1L muestran V_H-CDRs definidas mediante el sistema de Kabat, también están incluidas en la presente invención otras definiciones de CDR, por ejemplo, las V_H-CDRs definidas por el sistema Chothia, y pueden ser fácilmente identificadas por un experto en la técnica utilizando los datos presentados en cualquiera de las figuras 1A-1L.

En otra modalidad, la presente invención provee un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) en la cual las regiones V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas las cuales son idénticas a los grupos V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 mostrados en cualquiera de las figuras 1A-1L.

En otra modalidad, la presente invención provee un

polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) en la cual las regiones V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas las cuales son idénticas a los grupos V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 mostrados en cualquiera de las figuras 1A-1L respectivamente, excepto por una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácido en cualquiera de las V_H-CDR. En algunas modalidades las sustituciones de aminoácido son conservadoras.

En otra modalidad, la presente invención provee un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), en la cual por lo menos una de las V_L-CDRs de la región variable de la cadena ligera o por lo menos dos de las V_L-CDRs de la región variable de la cadena ligera son por lo menos 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las secuencias de aminoácido de V_L-CDR1, V_L-CDR2 o V_L-CDR3 de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. De manera alternativa, las regiones V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 de la V_L son por lo menos 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las secuencias de aminoácido de V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. Por lo tanto,

de conformidad con esta modalidad una región variable de la cadena ligera de la invención tiene secuencias de polipéptido de V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 relacionadas con los grupos mostrados en cualquiera de las figuras 1(A)-1(J) respectivamente. Aunque en cualquiera de las figuras 1(A)-1(L) se muestran V_L-CDRs definidas mediante el sistema de Kabat, también están incluidas en la presente invención otras definiciones de CDR, por ejemplo, las V_L-CDRs definidas por el sistema Chothia.

En otra modalidad, la presente invención provee un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) en la cual las regiones V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas las cuales son idénticas a los grupos V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 mostrados en cualquiera de las figuras 1(A)-1(L respectivamente.

En otra modalidad, la presente invención provee un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_L) en la cual las regiones V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas las cuales son idénticas a los grupos V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 mostrados en cualquiera de las figuras 1(A)-1(L) respectivamente, excepto

por una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácido en cualquier V_L-CDR. En algunas modalidades las sustituciones de aminoácido son conservadoras.

Una inmunoglobulina o su ADNc codificador pueden estar modificados adicionalmente. Por lo tanto, en una modalidad adicional, el método de la presente invención comprende cualquiera del paso o pasos para producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo de cadena individual, fragmento Fab, anticuerpo bi-específico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de cualquiera de los mismos. Los métodos correspondientes son conocidos por el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos mediante la técnica de despliegue en fago, se puede utilizar resonancia de plasmón de superficie, tal como se emplea en el sistema BIAcore, para incrementar la eficiencia de anticuerpos de fago los cuales se unen al mismo epítope que aquel de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente solicitud (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 89/09622. Los métodos para la

producción de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y en la solicitud internacional WO 90/07861. Otras fuentes de anticuerpos a utilizar de conformidad con la presente invención son los denominados anticuerpos xenogenéicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogenéicos tal como los anticuerpos de tipo humano en ratones se describe en, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735. Como se discutió anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de formas además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y $F(ab)_2$, así como en cadenas individuales; véase, por ejemplo solicitud internacional WO 88/09344. En una modalidad por lo tanto, se provee el anticuerpo de la presente invención, el cual se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fv de cadena individual (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento $F(ab')_2$.

Los anticuerpos de la presente invención o su cadena o cadenas de inmunoglobulina correspondientes se pueden modificar adicionalmente utilizando técnicas convencionales conocidas en el campo, por ejemplo, utilizando deleción(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) y/o recombinación(es)

de aminoácido y/o cualesquiera otras modificaciones conocidas en la técnica ya sea solas o en combinación. Los métodos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácido de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos por el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de la cadena lateral, modificaciones de la estructura base, y modificaciones N-terminales y C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la unión de porciones de carbohidrato o lípido, cofactores, y similares. De igual manera, la presente invención abarca la producción de proteínas quiméricas las cuales comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino terminal fusionado a molécula heteróloga tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo carboxilo terminal; véase, por ejemplo, solicitud internacional WO00/30680 para los detalles técnicos correspondientes.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden incluir modificaciones adicionales que optimizan su potencial terapéutico. Estas modificaciones comprenden pero no se limitan a modificaciones a la secuencia de aminoácido del anticuerpo (por ejemplo, las regiones variables) y modificaciones posteriores a la traducción. Las modificaciones posteriores a la traducción (PTMs) son modificaciones químicas que juegan un papel clave en la proteómica funcional, ya que éstas regulan la actividad, la localización y la interacción con otras moléculas celulares tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y cofactores. Por lo tanto, la optimización de los anticuerpos puede proveer varias ventajas tales como una estabilidad mejorada durante el almacenamiento, así como perfil farmacocinético y/o farmacodinámico tal como el tiempo de circulación in vivo o in vitro del anticuerpo, solubilidad incrementada, estabilidad, afinidad al objetivo incrementada, velocidad de disociación disminuida, una función efectora mejorada de la región constante (región Fc) y perfil de seguridad del anticuerpo, tal como una inmunogenicidad disminuida, o una susceptibilidad reducida a modificaciones posteriores a la traducción, como se muestra por ejemplo en Igawa *et al.*, MAbs 3 (2011), 243-52. Por consiguiente, en una modalidad de la presente invención se puede optimizar el

anticuerpo anti-DPR, fragmento de unión a DPR, variante sintética o biotecnológica del mismo, en el cual por lo menos un aminoácido en la CDR o región variable, el cual es propenso a modificaciones que incluyen pero no se limitan a acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, desamidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una porción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrelazamiento, ciclización, formación de puente de disulfuro, isomerización, desmetilación, formación de entralazamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, γ-carboxilación, glucosilación, formación de anclas de GPI, hidroxilación, hidrólisis, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, modificación con PEG, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia tal como arginilación y la ubiquitinación (véase, por ejemplo, Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Properties," 2ª eds., Freeman and Co., N.Y., 1992; "Postranslational Covalent Modification of Proteins," Johnson, eds., Academic Press, New York, 1983; Seifter *et al*., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan *et al*., Ann. NY. Acad.

Sci. 663 (1992) 48-62) se sustituye con un aminoácido mutado que carece de tal alteración o en el cual por lo menos una porción carbohidrato se elimina o se añade químicamente o enzimáticamente al anticuerpo. En una modalidad preferida, las modificaciones se seleccionan a partir del grupo que consiste de glucosilación, oxidación, desaminación, corte de enlaces peptídicos, formación de iso-aspartato y/o cisteína no apareada. Las modificaciones adicionales que optimizan la utilidad de los anticuerpos anti-DPR o moléculas de unión equivalentes como agente terapéutico son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Igawa et al., MAbs 3 (2011), 243-52 cuyo contenido de divulgación se incorpora en la presente solicitud. Los medios para añadir o eliminar porciones carbohidrato se pueden lograr químicamente o enzimáticamente y se describen en detalle en, por ejemplo, Berg *et al*. "Biochemistry" 5ª eds W H Freeman, New York 2002; WO 87/05330; Aplin *et al*., CRC Crit. Rev. Biochem., 22 (1981), 259-306; Hakimuddin *et al*., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987), 10-52; Edge *et al.,* Anal. Biochem. 118 (1981), 131; Thotakura *et al.,* Meth. Enzymol. 138. (1987), 350.

De manera adicional, la presente invención abarca péptidos incluyendo aquellos que contienen una molécula de unión como se describió anteriormente, por ejemplo que

contiene la región CDR3 de la región variable de cualquiera de los anticuerpos mencionados, en particular CDR3 de la cadena pesada, ya que frecuentemente se observa 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 se pueden sintetizar o producir fácilmente mediante medios recombinantes para producir un agente de unión útil de conformidad con la invención. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los péptidos se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando sintetizadores de péptido automatizados que están comercialmente disponibles. Los péptidos también se pueden producir mediante técnicas recombinantes incorporando el ADN que expresa el péptido en un vector de expresión y transformando células con el vector de expresión para producir el péptido.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a cualquier molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que está orientado hacia los anticuerpos anti-DPR de la presente invención y es capaz de unirse a las DPRs agregadas las cuales pueden estar presentes en una proteína por lo demás normal, por ejemplo especies de C9ORF72-DPR y/o fragmentos de las mismas. Dichos anticuerpos y moléculas

de unión se pueden analizar respecto a su especificidad y afinidad de unión mediante ELISA, SDS-PAGE e inmunohistoquímica como se describe en la presente solicitud, véase, por ejemplo, los Ejemplos 3 a 13. Estas características de los anticuerpos y moléculas de unión se pueden analizar también mediante Western Blot; véase, en particular, Ejemplo 6 y figuras 5A-5J.

Como una alternativa para obtener inmunoglobulinas directamente a partir del cultivo de células B o células B de memoria, las células se pueden utilizar como una fuente de loci de la cadena pesada y de la cadena ligera reacomodados para expresión subsiguiente y/o manipulación genética. Los genes de anticuerpo reacomodados se pueden transcribir en forma inversa a partir de moléculas de ARNm apropiadas para producir ADNc. Si se desea, la región constante de la cadena pesada se puede intercambiar por aquella de un isotipo diferente o eliminar completamente. Las regiones variables se pueden ligar para que codifiquen para regiones Fv de cadena individual. Se pueden ligar regiones Fv múltiples para conferir estabilidad de unión a más de un objetivo o se pueden utilizar combinaciones quiméricas de la cadena pesada y la cadena ligera. Una vez que el material genético está disponible, el diseño de análogos como se describió anteriormente que conserven tanto su capacidad

para unirse al objetivo deseado es sencillo. Los métodos para la clonación de las regiones variables de anticuerpo y generación de anticuerpos recombinantes son conocidos por el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, Gilliland *et al.*, Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke *et al.*, Leukemia 11 (1997), 1787-1792.

Una vez que el material genético apropiado es obtenido y, si se desea, modificado para que codifique para un análogo, las secuencias codificadoras, incluyendo aquellas que codifican, como mínimo, para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, se pueden insertar en sistemas de expresión contenidos en vectores los cuales se pueden transfectar en células hospederas recombinantes estándar. Se puede utilizar una variedad de dichas células hospederas; sin embargo, para procesamiento eficiente, se prefieren células de mamífero. Las líneas de células de mamífero típicas útiles para este propósito incluyen, pero no se limitan a, células CHO, células HEK 293, o células NSO.

La producción del anticuerpo o análogo se realiza después cultivando al hospedero recombinante modificado bajo condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento de las células hospederas y expresión de las secuencias codificadoras. Los anticuerpos después se recuperan aislándolos del cultivo.

Los sistemas de expresión de preferencia están diseñados para que incluyan péptidos de señal de modo que los anticuerpos resultantes sean secretados en el medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

De conformidad con lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica para el anticuerpo o molécula de unión equivalente de la presente invención, en caso del anticuerpo de preferencia por lo menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrita anteriormente. Típicamente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la 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 antes descrito se puede utilizar para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y función biológica deseada. Por lo tanto, la presente invención también abarca polipéptidos y anticuerpos que comprenden por lo menos una CDR del dominio variable antes descrito y los cuales de manera conveniente tienen sustancialmente las mismas propiedades de unión o propiedades de unión similares que las del anticuerpo descrito en los ejemplos anexos. El experto en la técnica sabe

que la afinidad de unión se puede incrementar haciendo sustituciones de aminoácido dentro de las CDRs o dentro de las asas hipervariables (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) las cuales se traslapan parcialmente con las CDRs como es definido por Kabat; véase, por ejemplo, Riechmann, *et al*, Nature 332 (1988), 323-327. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a anticuerpos en los cuales una o más de las CDRs mencionadas comprenden una o más, de preferencia no más de dos sustituciones de aminoácido. De preferencia, el anticuerpo de la invención comprende en una o ambas de sus cadenas de inmunoglobulina dos o todas las tres CDRs de las regiones variables como se indica en cualquiera de las figuras 1(A)-1(L).

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes sintéticas o biotecnológicas, o derivados de las mismas de la invención, como es sabido por los expertos en la técnica, pueden comprender una región constante la cual media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante del anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también

estimula la respuesta inflamatoria y también pueden estar implicada en hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a los receptores en diversas células a través de la región Fc, en los que un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Existe un número de receptores Fc los cuales son específicos para clases diferentes de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares dispara un número de respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo engullido y destrucción de partículas revestidas con anticuerpo, eliminación de complejos inmunes, lisis de células objetivo revestidas con anticuerpo por parte de las células asesinas (llamada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulina.

Por consiguiente, algunas modalidades de la presente invención incluyen un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en el cual por lo menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante ha sido eliminada o de alguna otra manera alterada

para proveer características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerizarse en forma no covalente, capacidad incrementada para ubicarse en el sitio de agregación y deposición de la proteína de DPR, tiempo de vida media en suero reducido, o tiempo de vida media en suero incrementado cuando se compara con un anticuerpo no alterado, completo de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, algunos anticuerpos para ser utilizados en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente solicitud son anticuerpos con dominio eliminado los cuales comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de por lo menos una porción de uno o más dominios de la cadena pesada. Por ejemplo, en algunos anticuerpos, se elimina un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, todo o una parte del dominio CH2 será eliminada. En otras modalidades, algunos anticuerpos para ser utilizados en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente solicitud tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de IgG, la cual se altera para eliminar la glucosilación, referida en alguna otra parte en la presente solicitud como anticuerpos aglucosilados o anticuerpos “aglu”. Dichos anticuerpos “aglu” se pueden

preparar enzimáticamente así como mediante diseño del sitio o sitios de glucosilación de consenso en la región constante. Aunque sin estar limitado por la teoría, se cree que los anticuerpos “aglu” pueden tener un perfil de seguridad y estabilidad mejorado in vivo. Los métodos para producir anticuerpos aglucosilados, que tengan la función efectora deseada se encuentran por ejemplo en la solicitud internacional WO 2005/018572, la cual se incorpora para referencia en su totalidad.

En algunos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en la presente solicitud, la porción Fc se puede mutar para disminuir la función efectora utilizando técnicas conocidas en el campo. Por ejemplo, la deleción o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado en circulación con lo cual se incrementa la ubicación de proteína de DPR. En otros casos podría ser que las modificaciones a la región constante consistentes con la presente invención moderen la unión al complemento y por lo tanto reduzcan el tiempo de vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Incluso se pueden utilizar otras modificaciones de la región constante para

modificar los enlazamientos de disulfuro o las porciones de oligosacárido que permiten la ubicación incrementada debido a especificidad de antígeno o flexibilidad de anticuerpo incrementadas. El perfil fisiológico, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como ubicación de proteína de DPR, biodistribución y tiempo de vida media en suero, se pueden medir y cuantificar fácilmente utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación indebida.

En algunos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en la presente solicitud, la porción Fc se puede mutar o intercambiar por secuencias de proteína alternativas para incrementar la captación celular de anticuerpos a manera de ejemplo incrementando la endocitosis de anticuerpos mediada por receptor a través de los receptores Fcγ, LRP, o los receptores Thy1 o mediante “Tecnología de Superanticuerpo”, la cual se dice permite que los anticuerpos sean lanzados hacia las células vivas sin dañarlas (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Por ejemplo, la generación de proteínas de fusión de la región de unión del anticuerpo y los ligandos de la proteína cognada de receptores de superficie celular o de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos con secuencias específicas que

se unen a las DPRs así como un receptor de superficie celular se puede diseñar utilizando técnicas conocidas en el campo.

En algunos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en la presente solicitud, la porción Fc se puede mutar o intercambiar por secuencias de proteínas alternativas o el anticuerpo se puede modificar químicamente para incrementar su penetración a la barrera hematoencefálica.

Las formas modificadas de anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden elaborar a partir de anticuerpos precursores o progenitores completos utilizando técnicas conocidas en el campo. Las técnicas de ejemplo se discuten con mayor detalle en la presente solicitud. Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden elaborar o fabricar utilizando técnicas que son conocidas en el campo. En algunas modalidades, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de los mismos se “producen de manera recombinante”, es decir, se producen utilizando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas de ejemplo para elaborar moléculas de anticuerpo o fragmentos de los mismos se discuten con mayor detalle en alguna otra parte en la presente solicitud.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes biotecnológicas o derivados de los mismos de la invención también incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo tal que la unión covalente no evite que el anticuerpo se una específicamente a su epítope cognado. Por ejemplo, pero no a manera de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, modificación con PEG, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, corte proteolítico, enlazamiento a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo utilizando técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a corte químico específico, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. De manera adicional, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En modalidades particulares preferidas, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados del mismo de la invención no provocan una respuesta inmune perjudicial en el animal a ser tratado, por ejemplo, en un humano. En algunas modalidades, las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los

mismos de la invención se derivan a partir de un paciente, por ejemplo, un paciente humano, y posteriormente se utilizan en la misma especie a partir de la cual éstos se derivaron, por ejemplo, humano, aliviando o reduciendo al mínimo la ocurrencia de respuestas inmunes perjudiciales.

La desinmunización también se puede utilizar para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “desinmunización” incluye alteración de un anticuerpo para modificar los epítopes de célula T; véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 98/52976 y WO 00/34317. Por ejemplo, se analizan las secuencias de V_H y V_L provenientes del anticuerpo de partida y un “mapa” de epítope de célula T de humano proveniente de cada región V que muestra la ubicación de los epítopes con relación a las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Se analizan los epítopes de célula T individuales provenientes del mapa de epítope de célula T con el fin de identificar sustituciones de aminoácido alternativas con un riesgo bajo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña una gama de secuencias de V_H y V_L alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácido y dichas secuencias se incorporan posteriormente en una gama de

polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos específicos de DPR o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para ser utilizados en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente solicitud, los cuales después se analizan respecto a función. Típicamente, se generan y analizan entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes completos de la cadena pesada y la cadena ligera que comprenden las regiones V modificada y C de humano se clonan después en vectores de expresión y los plásmidos subsiguientes se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpo entero. Los anticuerpos después se comparan en pruebas bioquímicas y biológicas apropiadas, y se identifica la variante óptima.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en el campo incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de despliegue en fago, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en el campo y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.,* Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N.Y., 563-681 (1981), dichas referencias se incorporan para

referencia en sus totalidades. El término “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente solicitud no está limitado a anticuerpos que se producen a través de tecnología de hibridoma. El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo que se deriva a partir de un clon individual, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o de fago, y no al método mediante el cual éste se produce. Por lo tanto, el término “anticuerpo monoclonal” no está limitado a anticuerpos que se producen a través de tecnología de hibridoma. En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente invención se derivan a partir de células B de humano las cuales han sido inducidas para producción de anticuerpo a través de transformación con el virus de Epstein-Barr, como se describe en la presente solicitud.

En el bien conocido procedimiento de hibridoma (Kohler *et al.*, Nature 256 (1975), 495) los linfocitos de vida relativamente corta, o mortales, provenientes de un mamífero, por ejemplo, células B derivadas a partir de un individuo humano como se describe en la presente solicitud, se fusionan con una línea de células de tumor inmortal (por ejemplo, una línea de célula de mieloma), produciendo, por lo tanto, células híbridas o “hibridomas” los cuales son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente de la célula B.

Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas individuales mediante selección, dilución, y recrecimiento en el que cada cepa individual comprende genes específicos para la formación de un anticuerpo individual. Estos producen anticuerpos, los cuales son homogéneos contra un antígeno deseado y, con referencia a su paternidad genética pura, se denominan “monoclonales”.

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y cultivan en un medio de cultivo apropiado que de preferencia contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma progenitoras no fusionadas. Los expertos en la técnica apreciarán que los reactivos, líneas celulares y medios para la formación, selección y crecimiento de hibridomas se pueden conseguir comercialmente a partir de un número de proveedores y los protocolos estandarizados están bien establecidos. En términos generales, el medio de cultivo en el cual se hacen crecer las células de hibridoma se analizan respecto a la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina utilizando pruebas in vitro tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o prueba con inmunosorbente ligado a

enzima (ELISA) como se describe en la presente solicitud. Después que se identifican las células de hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitantes y se cultivan utilizando métodos estándar; véase, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), 59-103. Se apreciará también que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero utilizando procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía con proteína A, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

En otra modalidad, los linfocitos se pueden seleccionar mediante micromanipulación y se aíslan los genes variables. Por ejemplo, se pueden aislar células mononucleadas de sangre periférica a partir de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, por ejemplo, un humano, y se cultivan durante aproximadamente 7 días in vitro. Los cultivos se pueden someter a tamizaje para IgGs específicas que satisfagan los criterios de tamizaje. Se pueden aislar las células provenientes de las cavidades positivas. La células B productoras de Ig individuales se pueden aislar mediante FACS o identificándolas

en una prueba en placa hemolítica mediada por complemento. Las células B productoras de Ig se pueden micromanipular en un tubo y los genes de V_H y V_L se pueden amplificar utilizando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes de V_H y V_L se pueden clonar en un vector de expresión de anticuerpo y transfectar en células (por ejemplo, células eucariotas o procariotas) para expresión.

De manera alternativa, las líneas celulares productoras de anticuerpo se pueden seleccionar y cultivar utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la técnica. Dichas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. En este sentido, las técnicas apropiadas para ser utilizadas en la invención como se describe más adelante se describen en Current Protocols in Immunology, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) la cual se incorpora en la presente solicitud para referencia en su totalidad, incluyendo los suplementos.

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo que reconozcan epítopes específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ se pueden producir de manera recombinante o mediante corte proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir los fragmentos Fab) o pepsina (para producir los

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 ser utilizados, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican acoplar las porciones inmunoespecíficas de las inmunoglobulinas a reactivos de detección tales como radioisótopos.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una CDR de una molécula de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos dos CDRs provenientes de una o más moléculas de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos tres CDRs provenientes de una o más moléculas de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos cuatro CDRs provenientes de una o más moléculas de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos cinco CDRs provenientes de una o más moléculas de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos seis CDRs provenientes de una o más moléculas de anticuerpo. Los ejemplos de moléculas de anticuerpo que comprenden por lo menos una CDR que se pueden incluir en los presentes anticuerpos se describen en la

presente solicitud.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o de preferencia mediante técnicas de expresión recombinantes como se describe en la presente solicitud.

En una modalidad, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una región constante sintética en la cual uno o más dominios están parcial o completamente eliminados ("anticuerpos de dominio eliminado"). En algunas modalidades los anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones o variantes de dominio eliminado en las cuales el dominio CH2 completo ha sido eliminado (construcciones ΔCH2). Para otras modalidades el dominio eliminado se puede sustituir con un péptido conector corto para proveer flexibilidad y libertad de movimiento para la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que dichas construcciones son particularmente preferidas debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 sobre la velocidad catalítica del anticuerpo. Las construcciones de dominio eliminado se pueden obtener utilizando un vector que codifique para un dominio constante de IgG_1 de humano, véase, por ejemplo, solicitudes internacionales

WO 02/060955 y WO 02/096948 A2. Este vector se diseña para eliminar el dominio CH2 y proveer un vector sintético que exprese una región constante de IgG_1 de dominio eliminado.

En algunas modalidades, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención son minicuerpos. Los minicuerpos se pueden elaborar utilizando métodos descritos en la técnica, véase, por ejemplo, patente E.U.A. 5,837,821 o solicitud internacional WO 94/09817. En una modalidad, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene deleción o sustitución de unos cuantos o incluso un solo aminoácido en tanto que esto permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido individual en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y de esa manera incrementar la localización de proteína de DPR. De manera similar, podría ser deseable simplemente eliminar aquella parte de uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión al complemento) a ser modulada. Dichas deleciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (tiempo de vida media en suero) al

tiempo que dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el presente dominio de la región constante. Asimismo, como se mencionó anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejoran el perfil de la construcción resultante. En este sentido podría ser posible interrumpir la actividad provista por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión a Fc) al tiempo que se mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Incluso otras modalidades comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para incrementar características deseables tales como una función efectora o proveer más citotoxina o unión de carbohidrato. En dichas modalidades podría ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas a partir de dominios de región constante seleccionados.

La presente invención también provee anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente de, o consisten de, variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones V_H y/o las regiones V_L) descritas en la presente solicitud, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen de manera inmunoespecífica a las DPRs. Se pueden utilizar técnicas estándar conocidas por los expertos en

la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótido que codifica para un anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR lo cual da como resultado sustituciones de aminoácido. De preferencia, las variantes (incluyendo derivados) codifican para menos de 50 sustituciones de aminoácido, menos de 40 sustituciones de aminoácido, menos de 30 sustituciones de aminoácido, menos de 25 sustituciones de aminoácido, menos de 20 sustituciones de aminoácido, menos de 15 sustituciones de aminoácido, menos de 10 sustituciones de aminoácido, menos de 5 sustituciones de aminoácido, menos de 4 sustituciones de aminoácido, menos de 3 sustituciones de aminoácido, o menos de 2 sustituciones de aminoácido con relación a la región V_H de referencia, V_H-CDR1, V_H-CDR2, V_H-CDR3, región V_L, V_L-CDR1, V_L-CDR2, o V_L-CDR3. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la cual el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Se han definido en la técnica las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico),

cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De manera alternativa, las mutaciones se pueden introducir de manera aleatoria a lo largo de todo o de una parte de la secuencia codificadora, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden tamizar respecto a la actividad biológica para identificar mutantes que conserven la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a las DPRs y/o especies de C9ORF72-DPR mutadas y/o agregadas y/o fragmentos de las mismas).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solamente en las regiones de estructura base o solamente en las regiones de CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser silenciosas o mutaciones de sentido equivocado neutras, por ejemplo, que no tienen o que tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para ligar al antígeno, de hecho algunas de dichas mutaciones no alteran la secuencia de aminoácido en absoluto. Estos tipos de

mutaciones pueden ser útiles para optimizar la utilización de codón, o para mejorar la producción de anticuerpo de un hibridoma. Las regiones codificadoras optimizadas en cuanto a codón que codifican para anticuerpos de la presente invención se describen en alguna otra parte en la presente solicitud. De manera alternativa, las mutaciones de sentido equivocado no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para ligar al antígeno. La ubicación de la mayoría de mutaciones silenciosas y de sentido equivocado neutras probablemente estará en las regiones de estructura base, mientras que la ubicación de la mayoría de las mutaciones de sentido equivocado no neutras probablemente esté en la CDR, aunque esto no es un requerimiento absoluto. Un experto en la técnica será capaz de diseñar y analizar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como no alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar de manera rutinaria y se puede determinar la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada, (por ejemplo, capacidad para unirse de manera inmunoespecífica a por lo menos un epítope de las DPRs y/o especies de C9ORF72-DPR mutadas y/o agregadas y/o

fragmentos de las mismas) utilizando técnicas descritas en la presente solicitud o mediante técnicas de modificación acostumbradas conocidas en la técnica.

III. Polinucleótidos que codifican para anticuerpos

Un polinucleótido que codifica para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar constituido por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, el cual puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar constituido por ADN de cadena sencilla o de cadena doble, ADN que es una mezcla de regiones de cadena doble y de cadena sencilla, ARN de cadena sencilla y de cadena doble y ARN que es una mezcla de regiones de cadena doble y cadena sencilla, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena sencilla o, más típicamente, de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble. Además, un polinucleótido que codifica para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar constituido por regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un

polinucleótido que codifica para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede contener una o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados para estabilidad o por otras razones. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se puede hacer una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por lo tanto, “polinucleótido” abarca formas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas.

Se puede crear un polinucleótido aislado que codifica para una variante no natural de un polipéptido derivado a partir de una inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de la cadena pesada o porción de la cadena ligera de inmunoglobulina) introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótido en la secuencia de nucleótido de la inmunoglobulina de modo tal que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácido en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir utilizando técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. De preferencia, las sustituciones de aminoácido conservadoras se hacen en uno o más residuos de aminoácido no esenciales.

Como es bien sabido, el ARN se puede aislar a partir de

células B originales, células de hibridoma o a partir de otras células transformadas mediante técnicas estándar, tales como extracción con isotiocianato de guanidinio y precipitación seguido por centrifugación o cromatografía. En donde sea deseable, el ARNm se puede aislar a partir del ARN total mediante técnicas estándar tales como cromatografía en oligo dT-celulosa. Las técnicas apropiadas son familiares en el campo. En una modalidad, las moléculas de ADNc que codifican para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo se pueden elaborar, ya sea simultáneamente o por separado, utilizando transcriptasa inversa y ADN polimerasa de conformidad con métodos bien conocidos. La PCR se puede iniciar utilizando iniciadores de región constante de consenso o con iniciadores más específicos tomando como base las secuencias de ADN de la cadena ligera y la cadena pesada y de aminoácido publicadas. Como se discutió anteriormente, la PCR también se puede utilizar para aislar clones de ADN que codifican para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En este caso las genotecas se pueden tamizar utilizando iniciadores de consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de la región constante de humano.

El ADN, típicamente ADN de plásmido, se puede aislar a partir de las células utilizando técnicas conocidas en el campo,

se mapea por restricción y se secuencia de conformidad con técnicas estándar, bien conocidas indicadas en detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores que se refieren a técnicas de ADN recombinante. Desde luego, el ADN puede ser sintético de conformidad con la presente invención en cualquier punto durante el procedimiento de aislamiento o análisis subsiguiente.

En este contexto, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica para por lo menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la presente invención. En una modalidad, la presente invención provee un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un ácido nucleico que codifica para una región variable de la cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina, en la cual por lo menos una de las CDRs de la región variable de la cadena pesada o por lo menos dos de las V_H-CDRs de la región variable de la cadena pesada son por lo menos 80%, 85%, 90%, o 95% idénticas a las secuencias de aminoácido de V_H-CDR1, V_H-CDR2, o V_H-CDR3 de la cadena pesada de referencia proveniente de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. De manera alternativa las regiones V_H-CDR1, V_H-CDR2, o V_H-CDR3 de la V_H son por lo menos 80%, 85%, 90%, o 95% idénticas a las secuencias de aminoácido de V_H-CDR1, V_H-CDR2, y V_H-CDR3 de la cadena

pesada de referencia proveniente de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. Por lo tanto, de conformidad con esta modalidad una región variable de la cadena pesada de la invención tiene secuencias de polipéptido de V_H-CDR1, V_H-CDR2, o V_H-CDR3 relacionadas con las secuencias de polipéptido mostradas en las figuras 1A-1L.

En otra modalidad, la presente invención provee un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un ácido nucleico que codifica para una región variable de la cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina, en la cual por lo menos una de las V_L-CDRs de la región variable de la cadena ligera o por lo menos dos de las V_L-CDRs de la región variable de la cadena ligera son por lo menos 80%, 85%, 90%, o 95% idénticas a las secuencias de aminoácido de V_L-CDR1, V_L-CDR2, o V_L-CDR3 de la cadena ligera de referencia proveniente de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. De manera alternativa las regiones V_L-CDR1, V_L-CDR2, o V_L-CDR3 de la V_L son por lo menos 80%, 85%, 90%, o 95% idénticas a las secuencias de aminoácido de V_L-CDR1, V_L-CDR2, y V_L-CDR3 de la cadena ligera de referencia proveniente de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. Por lo tanto, de conformidad con esta modalidad una región variable de la cadena ligera de la invención tiene secuencias de polipéptido de V_L-CDR1, V_L-

CDR2, o V_L-CDR3 relacionadas con las secuencias de polipéptido mostradas en cualquiera de las figuras 1A-1L.

En otra modalidad, la presente invención provee un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un ácido nucleico que codifica para una región variable de la cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina en la cual las regiones V_H-CDR1, V_H-CDR2, y V_H-CDR3 tienen secuencias de polipéptido las cuales son idénticas a los grupos V_H-CDR1, V_H-CDR2, y V_H-CDR3 mostrados en cualquiera de las figuras 1A-1L.

Como se sabe en la técnica, la "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos o dos polinucleótidos se determina comparando la secuencia de aminoácido o de ácido nucleico de un polipéptido o polinucleótido con la secuencia de un segundo polipéptido o polinucleótido. Cuando se discute en la presente solicitud, el que cualquier polipéptido particular sea por lo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% idéntico a otro polipéptido se puede determinar utilizando métodos y programas/software de computadora conocidos en la técnica tales como, pero sin limitarse a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI

53711). BESTFIT utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se utiliza BESTFIT o cualquier otro programa de alineación de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia de conformidad con la presente invención, los parámetros se ajustan, desde luego, de modo tal que el porcentaje de identidad se calcule a lo largo de la longitud completa de la secuencia de polipéptido de referencia y que se permitan huecos en la homología de hasta 5% del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

En una modalidad preferida de la presente invención, el polinucleótido comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótido de la región V_H o V_L de un anticuerpo anti-DPR como se representa en y la tabla II. En este sentido, el experto en la técnica apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican para por lo menos el dominio variable de la cadena ligera y/o la cadena pesada pueden codificar para el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina o solamente para una. En una modalidad por lo tanto, el polinucleótido comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un ácido

nucleico que tiene una secuencia de polinucleótido de la región V_H y la región V_L de un anticuerpo anti-DPR y/o fragmentos del mismo como se representa en la tabla II.

TABLA II

Secuencias de nucleótido de la región V_H y V_L de anticuerpos que reconocen DPRs, de preferencia C9ORF72-DPRs

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.18F7 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGG TGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCGTCACGTGCACTGTC TCTGGTGGCTCCATCAATGATTACTACTGGAACTGGAT CCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG GCGTATATATGCCAGTGGGACCATCAATTACAACCCTT CCCTCCAGAGTCGAGTCACCATGTCAATTGACACGTCC AAGAACCAGTTCTCCCTAGACCTCATCTCTGTGTCCGC CGCGGACACGGCCGTCTACTATTGTGCGAGATGGGGC CAGGTGGTCGGGGACTACTACTACGGGATGGACGTCT GGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 1
NI-308.18F7 V_K	TGCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGT CCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCA AGTCTAGTCAGAGCCTCCAACATACAAATGGATACAA TTACTTGGATTGGTACCTGCTGAAGCCAGGGCAGTCT CCACAACTCCTAATCTTCTTGACTTCTAATCGGGCCTC CGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGG CACAAATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATGTTGGGGTCTATTATTGCATGGAAGGTATAC AATTGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGA TCAAA SEQ ID NO: 3
NI-308.18F7 V_K - PIMC	TGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGT CCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCA AGTCTAGTCAGAGCCTCCAACATACAAATGGATACAA TTACTTGGATTGGTACCTGCTGAAGCCAGGGCAGTCT CCACAACTCCTAATCTTCTTGACTTCTAATCGGGCCTC CGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGG CACAAATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATGTTGGGGTCTATTATTGCATGGAAGGTATAC AATTGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA SEQ ID NO: 5

TABLA II (cont.)

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.15O7 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTA GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTGTCCTGTGCA GCCTCTGGATTCACCTTCAGTAATCATGCTATGCACT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGG

TABLA II (cont.)

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.5G2 V_H-PIMC	TGCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGACTTGC GGAACCCTGGGGCCTCAGTGACGGTTTCCTGCACGGC TTCTGGATACCATTTCGCTGACAATGCTATAAACTGGCT GCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGG TGGATCAACATTTACAGTGGTAACACAAAATATTCACAG AACTTCCAGGGCAGAGTCACCTTTACCAGAAACACATC CGCGAGCACAGCCTTCATGCACCTGCGCAGCCTGAGA TCAGAAGACACGGCTGTGTATTTCTGTGCGAGAGACCC TGATAGCAGTGGATATTACTTGCCCTATTTTGACTACTG GGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 17
NI-308.5G2 V_K-PIMC	TGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGA CTTTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAA GTCCAGCCAGAGTGTTTTCTACAACTCCAACAATAAG AACTACTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGC CTCCTAAGTTGCTCATGTACTGGGCATCTACCCGGGA GTCCGGGGTCACTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTC TGGGACAGATTTTACTCTCACCATTACCAACCTGCAG GCTGAAGATGTGGCAGTCTATTATTGTCAGCAATTTTA TAGTTCTCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAA SEQ ID NO: 19
NI-308.28G1 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAAGACTGG TGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCGCTCACGTGCACTGT CGCTGGCGGCTCCGTCAATAGTTACTATTGGACCTGGA TCCAGCAGTCCCCCGGGAAGGGACTGGAGTGGCTTGG GCGTATCTATATCGCTGGGAGGACCAACTATAACCCCT CCCTCACGAGTCGAATCGCCCTGTCAGTGGACACGTC CAGGAACCAGTTGTCCCTGAAGCTGACGTCTGTGACCG CCGCGGACACGGCCATATATTATTGTGCGAGATGGGG AGCGGAGAGTGGTGACTACTACTATGGAGTGGACGTCT GGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 21
NI-308.28G1 V_K	TGCGAAATTGTGATGACGCAGTCTCCACTCTCCCTGC CCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCA AGTCTAGTGAGGGACTCCTGCATAGTAATGGTTACAC CTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGGCT CCGCAGCTCCTGATCTTTCTGGCTTCTAATCGGGCCG CCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAG GCACAGATTTTACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGC TGAGGATGTTGGCGTTTATTACTGCATGCAGGCTATA CAAAGTCCTTGGACGTTCGGCCCAGGGACCAAGGTG GAAATCAAA SEQ ID NO: 23
NI-308.28G1 VH-PIMC	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAAGACTGG TGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCGCTCACGTGCACTGT CGCTGGCGGCTCCGTCAATAGTTACTATTGGACCTGGA TCCAGCAGTCCCCCGGGAAGGGACTGGAGTGGCTTGG GCGTATCTATATCGCTGGGAGGACCAACTATAACCCCT CCCTCACGAGTCGAATCGCCCTGTCAGTGGACACGTC CAGGAACCAGTTGTCCCTGAAGCTGACGTCTGTGACCG CCGCGGACACGGCCATATATTATTGTGCGAGATGGGG AGCGGAGAGTGGTGACTACTACTATGGAGTGGACGTCT GGGGCCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA SEQ ID NO: 25

TABLA II (cont.)

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.28G1 V_K-PIMC	TGCGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCC GTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTC TAGTGAGGGACTCCTGCATAGTAATGGTTACACCTATTT GGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGGCTCCGCAG CTCCTGATCTTTCTGGCTTCTAATCGGGCCGCCGGGGT CCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATT TTACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTT GGCGTTTATTACTGCATGCAGGCTATACAAAGTCCTTGG ACGTTCGGCCCAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA SEQ ID NO: 27
NI-308.45C2 V_H	TGCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGTCCAGGACTG GTGAAGCCCTCGCAGATCCTCTCACTCACCTGTGCCA TCTCCGGGGACAGTGTCTTCAGCAACAGTGCTGCTTG GAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGA GTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGGA TAATGATTATGCACCATCTGTGAAAAGTCGAATAAGTA TCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCA GTTGAATTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTAT TATTGTGCAAGAGAGGTCGCATATTGTGGTGGTGACT GCTATTCTGTTTCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 29
NI-308.45C2 V_K	TGCGAAATTGTGATGACACAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGT CTAGTCAGAGCCTCCTCCAGAGTAATGGATACACCTATT TGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG CTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGT CCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATT TTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTT GGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 31
NI-308.45C2 V_H - PIMC	TGCCAGCTGCAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTG GTGAAGCCCTCGCAGATCCTCTCACTCACCTGTGCCA TCTCCGGGGACAGTGTCTTCAGCAACAGTGCTGCTTG GAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGA GTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGGA TAATGATTATGCACCATCTGTGAAAAGTCGAATAAGTA TCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCA GTTGAATTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTAT TATTGTGCAAGAGAGGTCGCATATTGTGGTGGTGACT GCTATTCTGTTTCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTC CTCG SEQ ID NO: 33
NI-308.45C2 V_K - PIMC	TGCGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGC CCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCA GGTCTAGTCAGAGCCTCCTCCAGAGTAATGGATACAC CTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCT CCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCT CCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAG

TABLA II (cont.)

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.24E11 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTG TCTCTACTACTTCCCTCAGAAGTTATTTCTGGAGTTGG ATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGTATGTCTATTACAGTGGGAGTACCATCTACAATC CGTCCCTCAAGAATCGAGTCACCATATCCATAGACAC GTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAACCTGCGCTCTGTG ACCGCTGCGGATACGGCCATGTATTTCTGTGCGAGAG GCGTCCCGGCTGAGACTGATGCGCGGGACTTCCCGC CCTACTACTTTGATCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 37
NI-308.24E11 V_K	TGCGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCGTCAGTAGGAAACAGAATCACCTTCACTTGCCA GGCGAGTCAGGACATTAGATATTATTTAAATTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTA CGATGTGTCCAATTTGGATACAGGGGTGCCACCAAGG TTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAAATTTCACTTTCA CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAGTTTA TTACTGTCAACAGTATGAAGGACTCCCTGTGACCTTC GGCGGGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 39
NI-308.24E11 V_K - PIMC	TGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCGTCAGTAGGAAACAGAATCACCTTCACTTGCCA GGCGAGTCAGGACATTAGATATTATTTAAATTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTA CGATGTGTCCAATTTGGATACAGGGGTGCCACCAAGG TTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAAATTTCACTTTCA CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAGTTTA TTACTGTCAACAGTATGAAGGACTCCCTGTGACCTTC GGCGGGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 41
NI-308.46E9 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTGCACTG TCTCTGGTGCCTCCATCAGCGGTAGTACCTACTACTG GGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGA GTATATTGGGAGAATCTACTATAGTGGGAGCACCTAC TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGCCACCATATCTG TAGACACGTCCAAGAACCAGCTCTCCCTGACACTGAG TTCTGTGACCGCCGCAGATACGGCTGTGTATTATTGT GTGAGACCCTTTTACGCTGGTTCGGGGAACTCCCCCT TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCG SEQ ID NO: 43
NI-308.46E9 V_K	TGCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCGTGT

TABLA II (cont.)

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.46E9 V_H - PIMC	TGCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGG TGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTGCACTGTC TCTGGTGCCTCCATCAGCGGTAGTACCTACTACTGGGG CTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTAT ATTGGGAGAATCTACTATAGTGGGAGCACCTACTACAA CCCGTCCCTCAAGAGTCGAGCCACCATATCTGTAGACA CGTCCAAGAACCAGCTCTCCCTGACACTGAGTTCTGTG ACCGCCGCAGATACGGCTGTGTATTATTGTGTGAGACC CTTTTACGCTGGTTCGGGGAACTCCCCCTTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 47
NI-308.46E9 V_K - PIMC	TGCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCGTGT CTGTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGCCAGAGTGTTAGCACCAACTTAGCCTGGTA CCAGCAGAAACCTGGCCAGCCTCCCAGGCTCCTCATT TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCA GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGGCAGAGTTCACCC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGTTGT TTATTACTGTCAGCAATATAATAACTGGCCTCCGGCTT TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 49
NI-308.6B11 V_H	TGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTG AAGAGGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG GTTTCCGGATACACCCTCACTGAATTATCCATGCACT GGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGA TGGGAGGTTTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAGTCTA CGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGA GGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTG CAACATACGGCAGCAGCTGGCACTGGAATGAGGGAA ATGAGGGGTCCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACC GTCTCCTCG SEQ ID NO: 51
NI-308.6B11 V_K	TGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCA GGCGAGTCAGGACATTAGCATTTATTTAAATTGGTATC AGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA CGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGG TTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCA CCATCAGCGGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAAGATA

TABLA II (cont.)

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.46F8 V_H	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGG TACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCC TCTGGATTCACGTTTGATGAATATGGCATGAGCTGGGTC CGCCAAGTTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTG GCATTAATTGGAATGGAGCAACCACACGTTATGCAGACT CTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCC GAGGACACGGCCTTGTATCACTGTGCGAGAGATGGGTG TAGGAATACCAGCTGCTATATCTGGGACTGGTTCGATC CCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 57
NI-308.46F8 V_L	TGCCAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGC GGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGA AGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTATGCTGGTA CCAGAACCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTT ATGACGATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGG CATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTAT TACTGCGGAACATGGGACAGCAGCCTGAGTGTTGTGG TATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA SEQ ID NO: 59
NI-308.46F8 V_H - PIMC	TGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTG GTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACA GCCTCTGGATTCACGTTTGATGAATATGGCATGAGCT GGGTCCGCCAAGTTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCTGGCATTAATTGGAATGGAGCAACCACACGTTA TGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA GACAACGCCAAGAACTCCCTCTATCTGCAAATGAACA GTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTG CGAGAGATGGGTGTAGGAATACCAGCTGCTATATCTG GGACTGGTTCGATCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 61
NI-308.4M1 V_H	TGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGAA

TABLA II (cont.)

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.4M1 V_H - PIMC	TGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGAA GCCTCTGGATTCACCATCGGCACCTATGCCATGCACT GGGTCCGCCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGATTGGG TGGCAGTAATATCGTTCGATGGAACTACTGAGTACTA CACAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG AGACAATGCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAAC TACTTGAGAGGTGACGACACGGCTATATATTTCTGTG CGCGAGATTTCACCTCCTCGGGGGGAGACCGGTTCGT GGACACAAGTACCTGATCTCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 67
NI-308.4M1 V_K - PIMC	TGCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACGCTCTCCTGCA GGGCCAGTCAGAGTGTTACTAAATACTTAGCCTGGTA CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGTATCTTACAGGGCCGCTGGCACCCCAGCCA GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT CACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT TATTACTGTCACCAACGTAGCAGCTGGCCTCCGGTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 69
NI-308.12A3 V_H	TGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGCGTAGGC TCTGGATTTCTCTTCAGTGATTTTGAAATGGACTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCATA TATTAGTGGTGACGGTAATATCATATATCAGACAGACTC TGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCA AGAATTCACTGTTTCTACAAATGGACAGCCTGACCGTCG AGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAGACGCCCGT

TABLA II (cont.)

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de la cadena pesada variable (V_H) y la cadena ligera variable (V_L)
NI-308.12A3 V_K - PIMC	TGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGG CTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCA AGTCCAGCCAGAGTCTTTTATACACTGCCAACAATAG GAACTACTTAGCCTGGTACCAGAAAAAAGCAGGACAG CCTCCTAAGCTCCTCATTCACTGGGCATCTACCCGGG CATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGT CTGGGACAGATTTCATTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTTTTGTCAACATTATT ATAATTCTCCCCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAGATCAAA SEQ ID NO: 77
NI-308.16C10 V_H	TGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGATGTCCCTGAGCCTCTCCTGTGCA GCGACTGGATTCACCTTCAGCAGTTATGGCATGCACT GGGTCCGCCAAGGTCCAGGCAAGGGGCCGGAGTGG GTGGCGGGTATATGGTACGATGGAACAAATAAGTATT ATGGAGACTCCGTGACGGGCAGAGTCACCATCTCCA GAGACAACTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAT CAACGTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GTGAAGGATGCAGAGCGCGTCCAGAAATGGGCTAGT TACATTATGGACGTGTGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 79
NI-308. 16C10 V_K	TGCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGT CTTTGTCTCGAGGGAATCGGGTCGCCCTCTCCTGCAG GGCCAGTCGGAGTGTTAATAGCAGCTACTTAAATTGG

La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en cualquier otra parte. De manera adicional los polinucleótidos que codifican para polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab, y otros derivados biotecnológicos, como se describen en la presente solicitud, también están contemplados por la invención.

Los polinucleótidos se pueden producir o fabricar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la

secuencia de nucleótido del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica para el anticuerpo puede ser ensamblado a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados, por ejemplo, como se describe en Kutmeier *et al.*, BioTechniques 17 (1994), 242, el cual, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos que se traslapan que contienen porciones de la secuencia que codifica para el anticuerpo, fijación y ligación de dichos oligonucleótidos, y después amplificación de los oligonucleótidos ligados utilizando PCR.

De manera alternativa, se puede generar un polinucleótido que codifica para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo a partir de ácido nucleico proveniente de una fuente apropiada. Si no se dispone de un clon que contenga un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, se puede sintetizar químicamente un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo u obtener a partir de una fuente apropiada (por ejemplo, una genoteca de ADNc del anticuerpo, o una genoteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, de preferencia ARN poliA^+, aislar a partir de, cualquier tejido o células que expresen el anticuerpo específico de DPR, tal como células de hibridoma que se seleccionan para que expresen un anticuerpo) mediante amplificación con PCR

utilizando iniciadores sintéticos que se puedan hibridar a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia de gen particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc a partir de una genoteca de ADNc que codifica para el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR después se pueden clonar en vectores de clonación susceptibles de replicación utilizando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido correspondiente del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, su secuencia de nucleótido se puede manipular utilizando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótido, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 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), las cuales se incorporan para referencia en la presente solicitud en sus totalidades), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácido diferente, por ejemplo

para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácido.

IV. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

Después de la manipulación del material genético aislado para proveer anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican para los anticuerpos típicamente se insertan en un vector de expresión para introducción en células hospederas que se pueden utilizar para producir la cantidad deseada de anticuerpo. En la presente solicitud se describe la expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado, o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo el cual se une a una molécula objetivo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica para una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o porción del mismo (de preferencia que contiene el dominio variable de la cadena pesada o de la cadena ligera), de la invención, se puede producir el vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en el campo. Por lo tanto, en la presente solicitud se describen métodos para preparar una

proteína mediante expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótido que codifica para el anticuerpo. Se pueden utilizar métodos que sean bien conocidos por el experto en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo y las señales de control de transcripción y de traducción apropiadas. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas de síntesis, y recombinación genética in vivo. La invención, por lo tanto, provee vectores susceptibles de replicación que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica para una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de la cadena pesada o de la cadena ligera, ligado de manera operable a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótido que codifica para la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente E.U.A. no. 5,122,464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en dicho vector para expresión de la cadena pesada o ligera completa.

El término “vector” o “vector de expresión se utiliza en la presente solicitud para decir vectores utilizados de conformidad con la presente invención como un vehículo para introducir en y

expresar un gen deseado en una célula hospedera. Como es sabido por los expertos en la técnica, dichos vectores se pueden seleccionar fácilmente a partir del grupo que consiste de plásmidos, fagos, virus, y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenden un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación de gen deseado y la capacidad de ingresar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas. Para los propósitos de la invención, se pueden utilizar numerosos sistemas de vector de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN los cuales se obtienen a partir de virus animales tales como virus de papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV), o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión a ribosoma internos. De manera adicional, se pueden seleccionar células que tengan integrado el ADN en sus cromosomas introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de células hospederas transfectadas. El marcador puede proveer prototrofia a un hospedero auxotrófico, resistencia a biocida (por ejemplo, antibióticos), o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador seleccionable puede estar ya sea ligado directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar, o

se puede introducir en la misma célula mediante co-transformación. También podrían ser necesarios elementos adicionales para síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias de señal, señales de empalme, así como promotores de transcripción, incrementadores, y señales de terminación.

En modalidades particularmente preferidas los genes de la región variable clonados insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (de preferencia de humano) como se discutió anteriormente. En una modalidad, esto se logra utilizando un vector de expresión patentado de Biogen IDEC, Inc., referido como NEOSPLA, y descrito en la patente E.U.A. no. 6,159,730. Este vector contiene el promotor/incrementador de citomegalovirus, el promotor mayor de beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, los exones 1 y 2 de fosfotransferasa de neomicina, el gen de dihidrofolato reductasa, y la secuencia líder. Se ha encontrado que este vector da como resultado expresión de nivel muy alto de anticuerpos después de la incorporación de los genes de la región variable y constante, transfección en células CHO, seguido por seleccionan en medio que contiene G418 y

amplificación con metotrexato. Desde luego, se puede utilizar cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar la expresión en células eucariotas en la presente invención. Los ejemplos de vectores apropiados incluyen, pero no se limitan a los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, y pZeoSV2 (disponibles de Invitrogen, San Diego, CA), y el plásmido pCI (disponible de Promega, Madison, WI). En general, el tamizado de números grandes de células transformadas respecto a aquellas que expresan niveles adecuadamente altos si las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina es experimentación de rutina la cual se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando sistemas robóticos. Los sistemas de vector también se enseñan en las patentes E.U.A. nos. 5,736,137 y 5,658,570, cada una de las cuales se incorpora para referencia en su totalidad en la presente solicitud. Este sistema provee niveles de expresión altos, por ejemplo, > 30 pg/célula/día. Otros ejemplos de sistemas de vector se describen por ejemplo en la patente E.U.A. no. 6,413,777.

En otras modalidades preferidas los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden expresar utilizando construcciones policistrónicas tales como aquellas descritas en

la publicación de solicitud de patente E.U.A. no. 2003-0157641 A1 e incorporada en la presente solicitud en su totalidad. En estos sistemas de expresión, se pueden producir productos de gen múltiple de interés tales como las cadenas pesada y ligera de anticuerpos a partir de una construcción policistrónica individual. Estos sistemas de manera conveniente utilizan un sitio de entrada a ribosoma interno (IRES) para proveer niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias de IRES compatibles se describen en la patente E.U.A. no. 6,193,980 la cual también se incorpora en la presente solicitud. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión se pueden utilizar para producir de manera efectiva la gama completa de anticuerpos descritos en la presente solicitud. Por lo tanto, en una modalidad la presente invención provee un vector que comprende el polinucleótido que codifica para por lo menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo, opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifica para la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de dicha molécula de unión.

De manera más general, una vez que se ha preparado el vector o secuencia de ADN que codifica para una subunidad monomérica del anticuerpo, el vector de expresión se puede

introducir en una célula hospedera apropiada. La introducción del plásmido en la célula hospedera se puede lograr mediante varias técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero no se limitan a, transfección incluyendo lipotransfección utilizando, por ejemplo, Fugene® o lipofectamina, fusión de protoplasto, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección, e infección con virus intacto. Típicamente, la introducción del plásmido en el hospedero es a través del método estándar de co-precipitación con fosfato de calcio. Las células hospederas que alojan la construcción de expresión se hacen crecer bajo condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, y se analizan respecto a la síntesis de proteína de la cadena pesada y/o ligera. Los ejemplos de técnicas de análisis incluyen prueba con inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o análisis con clasificador de célula activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedera utilizando técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para ser utilizado en los métodos descritos en la presente solicitud. Por lo tanto, la

invención incluye células hospederas que comprenden un polinucleótido que codifica para un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o por lo menos el dominio de unión o región variable de una inmunoglobulina del mismo, el cual de preferencia está ligado de manera operable a un promotor heterólogo. Además de o de manera alternativa la invención también incluye células hospederas que comprenden un vector, como se definió anteriormente en la presente solicitud, que comprende un polinucleótido que codifica para por lo menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo, opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifica para la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de dicha molécula de unión. En modalidades preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, se puede co-expresar un vector individual o vectores que codifiquen para ambas cadenas la pesada y la ligera en la célula hospedera para expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla más adelante.

La célula hospedera se puede co-transfectar con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector codifica para un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica para un polipéptido derivado de la cadena ligera.

Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos los cuales permiten la expresión igual de los polipéptidos de la cadena pesada y la cadena ligera. De manera alternativa, se puede utilizar un vector individual que codifique para los polipéptidos tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se coloca de manera conveniente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica; véase Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197. Las secuencias codificadoras para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, “células hospederas” se refiere a células que alojan vectores que se construyen utilizando técnicas de ADN recombinante y que codifican para por lo menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procedimientos para aislamiento de anticuerpos a partir de hospederos recombinantes, los términos “célula” y “cultivo celular” se utilizan de manera intercambiable para denotar la fuente del anticuerpo a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido a partir de las “células” puede significar ya sea a partir de células enteras centrifugadas, o a partir del cultivo celular que contiene tanto el medio como las

células suspendidas.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de hospedero-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo para ser utilizadas en los métodos descritos en la presente solicitud. Dichos sistemas de expresión en hospedero representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias codificadoras de interés y purificar posteriormente, pero también representan células las cuales pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificadoras de nucleótido apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido plasmid DNA o ADN de cósmido que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión en levadura recombinantes que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; sistemas de célula de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; sistemas de célula vegetal infectada con vectores de expresión de virus recombinantes (por

ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras de anticuerpo; o sistemas de célula de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados a partir del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o a partir de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). De preferencia, se utilizan células bacterianas tales como *E. coli*, y de manera más preferida, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completo, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), en conjunto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor de citomegalovirus de humano es un sistema de expresión efectivo para anticuerpos; véase, por ejemplo, Foecking *et al.*, Gene 45 (1986), 101; Cockett *et al.*, Bio/Technology 8 (1990), 2.

La línea de célula hospedera utilizada para expresión de proteína con frecuencia es de origen mamífero; los expertos en

la técnica están acreditados con la capacidad de determinar en forma preferente líneas de célula hospedera particulares que sean las más adecuadas para el producto de gen deseado a ser expresado en las mismas. Los ejemplos de líneas celulares hospederas incluyen, pero no se limitan a, CHO (ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de hámster bebé), MDCK, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales de bovino), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón de humano). Las células CHO y 293 son particularmente preferidas. Las líneas de célula hospedera típicamente están disponibles a partir de servicios comerciales, el depósito americano de cultivos tipo (American Tissue Culture Collection) o a partir de la literatura publicada.

Además, se puede elegir una cepa de célula hospedera que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto del gen en el modo específico deseado. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, corte) de los productos de proteína

pueden ser importante para la función de la proteína. Células hospederas diferentes tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y modificación posterior a la traducción de proteínas y productos de gen. Se pueden elegir líneas de células o sistemas hospederos apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden utilizar células hospederas eucariotas que posean la maquinaria celular para procesamiento apropiado del transcrito primario, glucosilación, y fosforilación del producto de gen.

Para la producción a largo plazo, con rendimientos altos de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En vez de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células hospederas se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, incrementador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se puede dejar que las células diseñadas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el

plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar *foci* los cuales a su vez se pueden clonar y expandir como líneas celulares. Este método se puede utilizar de manera conveniente para diseñar líneas celulares que expresen de manera estable la molécula de anticuerpo.

Se puede utilizar un número de sistemas de selección, incluyendo pero sin limitarse a la timidina cinasa del virus de herpes simplex (Wigler *et al.*, Cell 11 (1977), 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22 (1980), 817) se pueden utilizar genes en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, se puede utilizar resistencia anti-metabolito como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, el cual confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527); gpt, el cual confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, el cual confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Goldspiel *et al.*, 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, el cual confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30 (1984), 147. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981), las cuales se incorporan para referencia en la presente solicitud en sus totalidades. Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden incrementar mediante amplificación del vector, para una revisión; véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987). Cuando un marcador en el sistema de vector expresa el anticuerpo es susceptible de amplificación, el incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedera incrementará el número de

copias del gen marcador. Debido a que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, también se incrementa la producción del anticuerpo; véase Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

La producción in vitro permite el escalamiento para obtener cantidades grandes de los polipéptidos deseados. Las técnicas para cultivo de célula de mamífero bajo condiciones de cultivo de tejidos son conocidas en el campo e incluyen cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo en un reactor con burbujeo de aire o en un reactor con agitador continuo, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas, en microglóbulos de agarosa o cartuchos de cerámica. Si fuera necesario y/o deseado, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante los métodos de cromatografía acostumbrados, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía por (inmuno-) afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferente de un polipéptido de la región de gozne sintético o antes de o posterior al paso de cromatografía HIC descrito en la presente solicitud.

Los genes que codifican para anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también se pueden expresar en células no mamíferos

tales como bacterias o células de insecto o de levadura o de plantas. Las bacterias que absorben fácilmente los ácidos nucleicos incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como cepas de *E. coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tales como *B. subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. También se apreciará que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente se vuelven parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos se pueden aislar, purificar y después ensamblar como moléculas funcionales. En casos en los que se desean formas tetravalentes de los anticuerpos, las subunidades después se auto-ensamblan como anticuerpos tetravalentes; véase, por ejemplo, solicitud internacional WO 02/096948.

En sistemas bacterianos, se puede seleccionar de manera conveniente un número de vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que está siendo expresada. Por ejemplo, cuando se va a producir una cantidad grande de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, podrían ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles altos de productos de proteína de fusión que ya están purificados. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO J. 2

(1983), 1791), en el cual la secuencia codificadora de anticuerpo puede estar ligada de manera individual en el vector en marco con la región que codifica para lacZ de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); y similares. También se pueden utilizar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de glóbulos de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para que incluyan sitios de corte de proteasa para trombina o el factor Xa de modo que el producto de gen objetivo clonado pueda ser liberado de la porción de GST.

Además de los procariotas, también se pueden utilizar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el más utilizado comúnmente entre los microorganismos eucariotas aunque están comúnmente disponibles un número de otras cepas, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Para expresión en *Saccharomyces*, comúnmente se utiliza el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb *et al.*, Nature

282 (1979), 39; Kingsman *et al.*, Gene 7 (1979), 141; Tschemper *et al.*, Gene 10 (1980), 157). Éste plásmido contiene de antemano el gen de TRP1 el cual provee un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). La presencia de la lesión trpl como una característica del genoma de la célula hospedera de levadura provee entonces un entorno efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insecto, típicamente se utiliza el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica para el anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y colocar bajo control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina).

Una vez que la molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado de manera recombinante, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligera y pesada individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, se pueden purificar de conformidad con procedimientos estándar de

la técnica, incluyendo por ejemplo mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, por afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico después de la proteína A, y cromatografía en columna para dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, por ejemplo precipitación con sulfato de amonio, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas; véase, por ejemplo, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). De manera alternativa, un método preferido para incrementar la afinidad de los anticuerpos de la invención se describe en la publicación de patente E.U.A. 2002-0123057 A1. En una modalidad por lo tanto, la presente invención también provee un método para preparar un anticuerpo anti-DPR o un anticuerpo que reconozca las especies mutadas y/o agregadas de C9ORF72-DPR y/o fragmentos de los mismos o cadena(s) de inmunoglobulina de los mismos, dicho método comprende:

(a) cultivar la célula hospedera como se definió anteriormente en la presente solicitud, cuya celular comprende un polinucleótido o un vector como se definió anteriormente en la presente solicitud; y

(b) aislar del medio de cultivo dicho anticuerpo o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo.

Asimismo, la presente invención también se refiere a un anticuerpo o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo codificado por un polinucleótido como se definió anteriormente en la presente solicitud o que se puede obtener mediante dicho método para preparar un anticuerpo anti-DPR o un anticuerpo que reconozca las especies mutadas y/o agregadas de C9ORF72-DPR y/o fragmentos del mismo o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo.

V. Proteínas de fusión y conjugados

En algunas modalidades, el polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido o una o más porciones no asociadas normalmente con un anticuerpo. Los ejemplos de modificaciones se describen con mayor detalle más adelante. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fv de cadena individual de la invención puede comprender una secuencia enlazadora flexible, o se puede modificar para agregar una porción funcional (por ejemplo PEG, un fármaco, una toxina, o una marca tal como una fluorescente, radioactiva, enzima, magnética nuclear, metal pesado y similares).

Un polipéptido de anticuerpo de la invención puede comprender, consistir esencialmente de, o consistir de una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas

quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a DPR de inmunoglobulina con por lo menos un sitio de unión a objetivo, y por lo menos una porción heteróloga, es decir, una porción con la cual ésta no está ligada de manera natural en la Naturaleza. Las secuencias de aminoácido normalmente pueden existir en proteínas separadas que se ponen juntas en el polipéptido de fusión o éstas pueden existir normalmente en la misma proteína pero son colocadas en un nuevo arreglo en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión se pueden crear, por ejemplo, mediante síntesis química, o creando y traduciendo un polipéptido en el cual las regiones de péptido son codificadas en la relación deseada.

El término "heterólogo" tal como se aplica a un polinucleótido o un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido se deriva a partir de una entidad distinta de aquélla del resto de la entidad con la cual éste está siendo comparado. Por ejemplo, tal como se utiliza en la presente solicitud, un "polipéptido heterólogo" que se va a fusionar a un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o análogo del mismo se deriva a partir de un polipéptido tipo no inmunoglobulina de la misma especie, o un polipéptido de inmunoglobulina o que no es de inmunoglobulina de una especie diferente.

Como se discute con mayor detalle en cualquier otra parte

en la presente solicitud, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden ser fusionados de manera recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N-terminal o C-terminal o conjugar químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden fusionar de manera recombinante o conjugar con moléculas útiles como marcas en pruebas de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos, o toxinas; véase, por ejemplo, solicitudes internacionales WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patente E.U.A. no. 5,314,995; y solicitud de patente europea EP 0 396 387.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención pueden estar constituidos por aminoácidos unidos uno al otro mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isósteros de péptido, y pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos codificados por gen. Los anticuerpos pueden ser modificados por procesos naturales, tales como procesamiento posterior a la traducción, o mediante técnicas de modificación química las cuales son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en los

textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una literatura de investigación voluminosa. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte en el anticuerpo, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácido y los extremos amino terminal o carboxilo terminal, o en porciones tales como carbohidratos. Se apreciará que puede estar presente el mismo tipo de modificación en el mismo grado o en grados variables en varios sitios en un anticuerpo dado. Además, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y estos pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y ramificados cíclicos pueden resultar de procesos naturales posteriores a la traducción o se pueden elaborar mediante métodos de síntesis. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una porción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrelazamiento, ciclización, formación de puente de disulfuro, desmetilación, formación de entrelazamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación,

glucosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, modificación con PEG, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia tal como arginilación, y ubiquitinación; véase, por ejemplo, Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2ª Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, (1983) 1-12; Seifter *et al.*, Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan *et al.*, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62).

La presente invención también provee proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo, y un polipéptido heterólogo. En una modalidad, una proteína de fusión de la invención comprende, consiste esencialmente de, o consiste de, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de cualquiera de una o más de las regiones de V_H de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácido de cualquiera de una o más de las regiones de V_L de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo. En otra modalidad, una proteína de

fusión para ser utilizada en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente solicitud comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de cualquiera de una, dos, tres de las V_H-CDRs de un anticuerpo, o fragmentos, variantes, o derivados del mismo, o la secuencia de aminoácido de cualquiera de una dos, tres de las V_L-CDRs de un anticuerpo, o fragmentos, variantes, o derivados del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo. En una modalidad, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de una V_H-CDR3 de un anticuerpo de la presente invención, o fragmento, derivado, o variante del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo, cuya proteína de fusión se une específicamente a las proteínas o péptidos de DPR. En otra modalidad, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de por lo menos una región de V_H de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácido de por lo menos una región de V_L de un anticuerpo de la invención o fragmentos, derivados o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo. De preferencia, las regiones de V_H y V_L de la proteína de fusión corresponden a un anticuerpo de fuente individual (o fragmento scFv o Fab) el cual se une específicamente a las DPRs. Incluso en otra modalidad,

una proteína de fusión para ser utilizada en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente solicitud comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de cualquiera de una, dos, tres, o más de las V_H CDRs de un anticuerpo y la secuencia de aminoácido de cualquiera de una, dos, tres, o más de las V_L CDRs de un anticuerpo, o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo. De preferencia, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más de las V_H-CDR(s) o V_L-CDR(s) corresponden al anticuerpo de fuente individual (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican para estas proteínas de fusión también están abarcadas por la invención.

Los ejemplos de proteínas de fusión reportados en la literatura incluyen fusiones del receptor de célula T (Gascoigne *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon *et al.*, Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker *et al.*, Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353; y Byrn *et al.*, Nature 344 (1990), 667-670); L-selectina (receptor de retorno (homing receptor)) (Watson *et al.*, J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221-2229; y Watson *et al.*, Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo *et al.*, Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 173 (1991),721-730); CTLA-4 (Lisley *et al.*, J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569);

CD22 (Stamenkovic *et al.*, Cell 66 (1991), 1133-1144); receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; y Peppel *et al.*, J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991); y receptor a de IgE (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Abstract No. 1448).

Como se discute en cualquier otra parte en la presente solicitud, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden fusionar con polipéptidos heterólogos para incrementar el tiempo de vida media *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos que utilizan métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad, se puede conjugar PEG a los anticuerpos de la invención para incrementar su tiempo de vida media *in vivo*; véase, por ejemplo, Leong *et al.*, Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir *et al.*, Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Además, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes sintéticas, o derivados biotecnológicos de los mismos de la invención se pueden fusionar con secuencias de marcador, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En modalidades preferidas, la secuencia de aminoácido de marcador es un péptido de hexa-histidina (HIS),

tal como la marca provista en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina provee una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcas de péptido útiles para purificación incluyen, pero no están limitadas a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítope obtenido a partir de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, Cell 37 (1984), 767), GST, c-mycand the "flag" tag; véase, por ejemplo, Bill Brizzard, BioTechniques 44 (2008) 693-695 para una revisión de técnicas de marcado de epítope, y la tabla 1 en la página 694 del mismo que enumera las marcas de epítope más comunes que se pueden utilizar en la presente invención, cuya materia objeto se incorpora expresamente para referencia.

Las proteínas de fusión se pueden preparar utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, las patentes E.U.A. nos. 5,116,964 y 5,225,538. El sitio preciso en el cual se realiza la fusión se puede seleccionar empíricamente para optimizar las características de secreción o unión de la proteína de fusión. El ADN que codifica para la proteína de fusión después se transfecta en una célula hospedera para expresión, la cual se lleva a cabo como se

describió anteriormente en la presente solicitud.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en forma no conjugada o se pueden conjugar con por lo menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de blancos, o para la formación de imágenes o terapia del paciente. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden marcar o conjugar ya sea antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden conjugar con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

Los conjugados que son inmunotoxinas incluyendo anticuerpos convencionales han sido ampliamente descritos en la técnica. Las toxinas se pueden copular a los anticuerpos mediante técnicas de copulación convencionales o se pueden producir porciones de toxina de proteína que contiene inmunotoxinas como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar de una manera correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Son

ilustrativas de dichas inmunotoxinas las descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59 - 70 y por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Los expertos en la técnica apreciarán que los conjugados también se pueden ensamblar utilizando una variedad de técnicas que dependen del agente seleccionado a ser conjugado. Por ejemplo, se preparan conjugados con biotina, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión a DPR con un éster activado de biotina tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. De manera similar, los conjugados con un marcador fluorescente se pueden preparar en presencia de un agente de copulación, por ejemplo aquellos enumerados en la presente solicitud, o mediante reacción con un isotiocianato, de preferencia un isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se preparan en una manera análoga.

La presente invención abarca además anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención conjugados a un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos se pueden utilizar de manera diagnóstica para, por ejemplo, demostrar la presencia de una DPR para indicar el riesgo de contraer una enfermedad o

trastorno asociado con DPRs, de preferencia asociado con DPRs que forman C9ORF72 mutada, es decir, C9ORF72-DPRs, para monitorear el desarrollo o avance de dicha enfermedad, es decir, una enfermedad que muestra la ocurrencia de, o relacionada con DPR agregadas, o como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento y/o prevención dado. Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención se refiere a un anticuerpo, el cual se marca de manera detectable. Además, en una modalidad, la presente invención se refiere a un anticuerpo, el cual está unido a un fármaco. La detección se puede facilitar copulando el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo a una sustancia detectable. Las sustancias o marca detectables pueden ser en general una enzima; un metal pesado, de preferencia oro; un colorante, de preferencia un colorante fluorescente o luminiscente; o una etiqueta radioactiva. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales que emiten positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radioactivos; véase, por ejemplo, la patente E.U.A. 4.741.900 para iones

metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para usarse como productos para diagnóstico de conformidad con la presente invención. Los ejemplos de enzimas apropiadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético apropiados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes apropiados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acuorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In o ^{99}Tc. Por lo tanto, en una modalidad la presente invención provee un anticuerpo marcado de manera detectable, en el cual la marca detectable se selecciona a partir del grupo que consiste de una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado.

También se puede marcar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de manera detectable copulándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado de manera quimioluminiscente después se determina detectando la presencia de luminiscencia

que surge durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos para marcado quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

Una de las formas en las que se puede marcar de manera detectable un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo es enlazando el mismo a una enzima y utilizando el producto ligado en un inmunoensayo con enzima (EIA) (Voller, A., "The Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Maryland, Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller *et al*., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, *et al*., (Eds.), Enzyme Immunoassay, Kgaku Shoin, Tokyo (1981). La enzima, la cual está unida al anticuerpo, reaccionará con un substrato apropiado, de preferencia un substrato cromogénico, de manera tal que se produzca una porción química que se pueda detectar, por ejemplo, por medio espectrofotométrico, fluorimétrico o visual. Las enzimas que se pueden utilizar para marcar de manera detectable el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-

glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Adicionalmente, la detección se puede lograr utilizando métodos colorimétricos que emplean un substrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede lograr mediante la comparación visual del grado de la reacción enzimática de un substrato en comparación con patrones preparados de forma similar.

La detección también se puede lograr utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando de manera radioactiva el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, 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)), el cual se incorpora en la presente solicitud para referencia). El isótopo radiactivo se puede detectar utilizando medios que incluyen, pero no se limitan a, un contador gamma, un contador de centelleo o autorradiografía.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante,

o derivado del mismo, también se puede marcar de manera detectable utilizando metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metal tales como ácido dietilentriaminpentacético (DTPA) o ácido etilendiamintetra-acético (EDTA).

Las técnicas para conjugar diversas porciones a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon *et al*., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al*. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al*., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al*. (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1987) 623-53; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al*. (eds.), (1985) 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al*. (eds.), Academic Press (1985) 303-16, and Thorpe *et al*., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol.

Rev. 62 (1982), 119-158.

Tal como se mencionó, en algunas modalidades, se puede conjugar una porción que mejora la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, por ejemplo, un polipéptido de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento inmunoespecífico del mismo. Por ejemplo, en una modalidad, se puede conjugar PEG con las moléculas de unión de la invención para incrementar su tiempo de vida media *in vivo*. Leong *et al*., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir *et al*., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

VI. Composiciones y métodos de uso

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión a DPR mencionada anteriormente de la presente invención, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado biotecnológico del mismo, o el polinucleótido, vector o célula de la invención como se definió anteriormente en la presente solicitud. En una modalidad, la composición de la presente invención es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales tales como interleucinas o

interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Para usarse en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que muestra la ocurrencia de, o relacionado con DPR agregadas, en particular C9ORF72-DPRs, tal como FTLD, el agente adicional se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-DPR, y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, en una modalidad preferida particular, la presente invención se refiere al uso de la molécula de unión a DPR, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o de una molécula de unión que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de las mismas, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una enfermedad o trastorno asociado con proteínas de DPR, monitorear el avance de una enfermedad o trastorno asociado con proteína de DPR y/o C9ORF72 agregada o una respuesta a un tratamiento con DPR en un individuo o para determinar el riesgo de un individuo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la proteína de DPR y/o C9ORF72-DPR agregadas.

Por lo tanto, en una modalidad la presente invención se

refiere a un método para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por acumulación anormal y/o deposición de DPR y proteínas de DPR tales como C9ORF72 agregada debido a las C9ORF72-DPRs, cuyo método que comprende administrar a un individuo en necesidad de lo mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de las moléculas, anticuerpos, polinucleótidos, vectores o células de unión a DPR descritas anteriormente de la presente invención.

Una ventaja particular de la estrategia terapéutica de la presente invención reside en el hecho que los anticuerpos recombinantes de la presente invención se obtienen a partir de células B o células B de memoria provenientes de individuos humanos sanos sin signos o síntomas de una enfermedad, por ejemplo que portan una mutación y/o mutaciones asintomáticas, que muestran la ocurrencia de, o relacionadas con las DPR agregadas y, por lo tanto son, con una cierta probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad clínicamente manifiesta relacionada con las DPR, por ejemplo C9ORF72 mutada con repeticiones de hexanucleótidos expandidas dando como resultado la formación de la repetición de dipéptido (DPR) en la proteína C9ORF72 una C9ORF72 agregada debido a las C9ORF72-DPRs, o de disminuir el riesgo de la ocurrencia de la enfermedad o trastorno clínicamente manifiesto o de retrasar el

inicio o avance de la enfermedad o trastorno clínicamente manifiesto. Típicamente, los anticuerpos de la presente invención también han pasado ya con éxito por maduración somática, es decir, la optimización con respecto a la selectividad y efectividad en la unión de afinidad alta a la molécula de DPR objetivo por medio de la variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

El conocimiento respecto a que dichas células *in vivo*, por ejemplo en un humano, no han sido activados por medio de proteínas relacionadas u otras proteínas fisiológicas o estructuras celulares en el sentido de una reacción autoinmunológica o alérgica es también de gran importancia médica, ya que esto significa una probabilidad considerablemente incrementada de sobrevivir con éxito las fases de pruebas clínicas. Por así decirlo, la eficiencia, aceptabilidad y tolerabilidad ya han sido demostradas antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en por lo menos un individuo humano. Por lo tanto, se puede esperar que los anticuerpos anti-DPR derivados de humano de la presente invención, tanto su alta afinidad específica de estructura objetivo como agente terapéutico como su probabilidad disminuida de efectos secundarios incrementen significativamente su probabilidad clínica de éxito.

La presente invención también provee un paquete o kit farmacéutico y de diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más contenedores llenados con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, por ejemplo anticuerpo anti-DPR, fragmento de unión, derivado biotecnológico o variante del mismo, polinucleótido, vector o célula de la presente invención. Un aviso puede estar asociado con dicho o dichos contenedores en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración en humanos. Además o de manera alternativa, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para usarse en pruebas de diagnóstico apropiadas. La composición, por ejemplo el kit de la presente invención es, por supuesto, particularmente apropiado para la evaluación del riesgo, diagnóstico, prevención y tratamiento de una enfermedad o trastorno el cual está acompañado con la presencia de DPRs y en particular aplicable para el tratamiento de trastornos caracterizados generalmente por la presencia de DPRs. En particular, la composición es útil en el tratamiento de trastornos que están relacionados con la agregación de DPR, por ejemplo C9ORF72 mutada con repeticiones de hexanucleótido expandidas que dan como

resultado la formación de C9ORF72 agregada debido a las C9ORF72-DPRs. Las enfermedades y/o trastornos asociados con DPRs comprenden, pero no se limitan a, degeneración frontotemporal lobular (FTLD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), FTLD-ALS y/o ataxia espinocerebelar tipo 36.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se puede formular de conformidad con métodos bien 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. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos apropiados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular utilizando métodos convencionales bien conocidos. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al individuo a una dosis apropiada. La administración de las composiciones apropiadas se puede efectuar por diferentes vías, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, tópica o intradérmica o suministro espinal o cerebral. Las formulaciones en aerosol tales como formulaciones en aerosol nasal incluyen

soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo con agentes conservadores y agentes isotónicos. Dichas formulaciones de preferencia se ajustan a un pH y un estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio con un vehículo apropiado.

El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado y los factores clínicos. Como es bien conocido en las artes médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el género, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se están administrando de manera concurrente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0.001 a 1000 µg (o de ácido nucleico para la expresión o para la inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo de ejemplo, especialmente considerando los factores antes mencionados. En términos generales, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg y más habitualmente de 0.01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 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 hospedero. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, de preferencia por lo menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la invención. Se pueden administrar dichas dosis a los individuos diariamente, en días alternados, semanalmente o de conformidad con cualquier otro programa determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo implica la administración en dosis múltiples durante un período prolongado, por ejemplo, de por lo menos seis meses. Los regímenes de tratamiento de ejemplo adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternados o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, se administran dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión de manera simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El progreso se puede monitorear mediante evaluación periódica. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y

emulsiones. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina, y medios amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada, o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de líquidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservadores y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

Además, en una modalidad preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se puede formular como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti-DPR o fragmento de unión a DPR, o variante sintética o biotecnológica o derivado

del mismo para la inmunización pasiva. Como se menciona en la sección de antecedentes, las especies de DPR agregadas son un desencadenante principal para enfermedades y/o trastornos tales como FTLD y ALS. Por consiguiente, es prudente esperar que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-DPR derivados de humano y moléculas de unión a DPR equivalentes de la presente invención ayudará a eludir varios efectos adversos de los conceptos de terapia de inmunización activa y conducir a una agregación reducida de DPRs. Por lo tanto, los presentes anticuerpos anti-DPR y sus equivalentes de la presente invención serán particularmente útiles como una vacuna para la prevención o mejora de enfermedades o trastornos que muestran la presencia de, u ocasionados por DPRs agregadas, en particular C9ORF72-DPRs, tales como FTLD.

En una modalidad, podría ser benéfico utilizar el Fab recombinante (rFab) y los fragmentos de cadena individual (scFvs) del anticuerpo de la presente invención, que podrían penetrar más fácilmente una membrana celular. Por ejemplo, Robert *et al*., Protein Eng. Des. Sel. (2008); S1741-0134, publicado en línea con antelación, describe el uso de Fab recombinante (rFab) quimérico y fragmentos de cadena individual (scFvs) del anticuerpo monoclonal WO-2 que reconoce un epítope en la región N-terminal de Abeta. Los fragmentos

diseñados son capaces de (i) prevenir la formación de fibrilla amiloide, (ii) desagregar las fibrillas Abeta1-42 preformadas y (iii) inhibir la neurotoxicidad mediada por oligómero Abeta1-42 *in vitro* de manera tan eficiente como la molécula de IgG entera. Las ventajas percibidas de utilizar formatos de anticuerpo diseñado de Fab y scFv pequeños que carecen de la función efectora incluyen un paso más eficiente a través de la barrera hematoencefálica y reducir al mínimo el riesgo de desencadenar reacciones secundarias inflamatorias. Asimismo, además del scFv y el dominio individual los anticuerpos conservan la especificidad de unión de anticuerpos de longitud completa, éstos se pueden expresar como genes individuales y de manera intracelular en células de mamífero como intracuerpos, con el potencial de alteración del plegamiento, interacciones, modificaciones o localización subcelular de sus objetivos; véase para revisión, por ejemplo, Miller y Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394 - 401.

En una estrategia diferente Muller *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241, describen una plataforma tecnológica, la denominada "Tecnología de SúperAnticuerpo", la cual se dice permite que los anticuerpos sean lanzadoss dentro las células vivas sin dañarlas. Tales anticuerpos que penetran las células abren nuevas ventanas de diagnóstico y terapéuticas. El término

'TransMabs' ha sido acuñado para estos anticuerpos.

En una modalidad adicional, puede ser deseable la co-administración o la administración secuencial de otros anticuerpos útiles para tratar una enfermedad, trastorno o síntomas relacionados con la ocurrencia de DPRs, en particular DPR agregadas tales como C9ORF72-DPRs. En una modalidad, el anticuerpo adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos de anticuerpos que se pueden utilizar para tratar un individuo incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que eligen como blanco a CD33, SGLT2, IL-6 e IL-1.

En una modalidad adicional, puede ser deseable la co-administración o administración secuencial de otros agentes útiles para tratar una enfermedad, trastorno o síntomas relacionados con DPR, en particular DPR agregadas tales como C9ORF72 mutada, es decir, C9ORF72-DPRs. En una modalidad, el agente adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos de agentes que se pueden utilizar para tratar un individuo incluyen, pero no están limitados a: inhibidores de VMAT2 que eligen como blanco movimientos musculares involuntarios tales como agentes anti-inflamatorios tales como diflusinal, corticosteroides, ácido 2-(2,6-dicloranilino)fenilacético (diclofenac), acido iso-butil-

propanoico-fenólico (ibuprofeno); diuréticos, galato de epigalocatequina, clorhidrato de melfalán, dexametasona, bortezomib, bortezomib-melfalán, bortezomib-dexametasona, melfalan-dexametasona, bortezomib-melfalan-dexametasona; antidepresivos, fármacos antipsicóticos, neurolépticos, antidemeníticos (por ejemplo el antagonista del receptor de NMDA memantina), inhibidores de acetilcolinesterasa (por ejemplo Donepezil, HCI, Rivastigmina, Galantamina), antagonistas de glutamato y otros fármacos nootrópicos para la presión sanguínea (por ejemplo, dihidralazina, metildopa), citostáticos, glucocorticoides, Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE); agentes antiinflamatorios o cualquier combinación de los mismos.

Una dosis o cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad del ingrediente activo suficiente para mejorar los síntomas o la condición. La eficacia terapéutica y la toxicidad de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) y DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación, DL_{50}/DE_{50}.

A partir de lo descrito anteriormente, es evidente que la presente invención abarca cualquier uso de una molécula de unión a DPR que comprende por lo menos una CDR del anticuerpo descrito anteriormente, en particular para el diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con las DPR, en particular especies de DPR agregadas tales como C9ORF72-DPRs, tal como FTLD. De preferencia, dicha molécula de unión es un anticuerpo de la presente invención o un derivado biotecnológico del mismo. Además, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-idiotípicos de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente en la presente solicitud. Estos son anticuerpos u otras moléculas de unión que se unen a la secuencia peptídica antigénica única ubicada en la región variable de un anticuerpo cerca del sitio de unión a antígeno y son útiles, por ejemplo, para la detección de anticuerpos anti-DPR en una muestra obtenida a partir de un individuo. Por lo tanto en una modalidad, la presente invención provee un anticuerpo tal como se definió anteriormente en la presente solicitud y como se define más adelante o una molécula de unión a DPR que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de conformidad con cualquiera de los mismos, el polinucleótido, el vector o la célula como se define en la presente solicitud o una

composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende cualquiera de los mismos para usarse en el tratamiento profiláctico, tratamiento terapéutico y/o para monitorear el avance o una respuesta al tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con las DPR. En una modalidad preferida de la presente invención, la enfermedad y/o trastorno está asociado con DPR agregadas. En una modalidad preferida particular, la enfermedad y/o trastorno está asociado con C9ORF72-DPRs, tal como en FTLD y ALS.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende cualquiera de las moléculas de unión a DPR descritas anteriormente, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, polinucleótidos, vectores o células de la invención y opcionalmente medios apropiados para detección tales como reactivos utilizados convencionalmente en métodos de inmunodiagnóstico o basados en ácido nucleico. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, apropiados para usarse en inmunoensayos en los cuales éstos se pueden utilizar en fase líquida o unirse a un vehículo en fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en cualquiera de un formato directo o indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), el

emparedado (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y la prueba Western blot. Los antígenos y anticuerpos de la invención se pueden unir a muchos vehículos diferentes y se pueden utilizar para aislar células unidas específicamente a los mismos. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nilón, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser ya sea soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Existen muchas marcas diferentes y métodos para marcar conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de los tipos de marcas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véase también las modalidades discutidas anteriormente en la presente solicitud.

En una modalidad adicional, las moléculas de unión a DPR, en particular los anticuerpos de la presente invención, también se pueden utilizar en un método para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un individuo obteniendo una muestra de fluido corporal a partir del individuo analizado la cual puede ser una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra

de suero, una muestra de linfa o cualquier otra muestra de fluido corporal, tal como una muestra de saliva o de orina y poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención bajo condiciones que permiten la formación de complejos anticuerpo-antígeno. El nivel de dichos complejos después se determina utilizando métodos conocidos en la técnica, un nivel significativamente más alto que el formado en una muestra de control que indica la enfermedad o trastorno en el individuo analizado. De la misma manera, también se puede utilizar el antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

En una modalidad adicional de la presente invención, las moléculas de unión a DPR, en particular anticuerpos de la presente invención, también se pueden utilizar en un método para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un individuo obteniendo una biopsia del individuo analizado.

En este contexto, la presente invención también se refiere a medios diseñados específicamente para este propósito. Por ejemplo, se puede utilizar un arreglo basado en anticuerpo, el cual está por ejemplo cargado con anticuerpos o moléculas de

unión a antígeno equivalentes de la presente invención la cuales reconocen específicamente las DPR. El diseño de los inmunoensayos de microarreglo se resume en Kusnezow *et al*., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681 - 1669. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a microarreglos cargados con moléculas de unión a DPR identificadas de conformidad con la presente invención.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno relacionado con DPRs, en particular especies de DPR agregadas tales como C9ORF72-DPRs en un individuo, el método comprende determinar la presencia de DPR y DPR agregadas, respectivamente, en una muestra proveniente del individuo que va que va a ser diagnosticado con por lo menos un anticuerpo de la presente invención, un fragmento de unión a DPR del mismo o una molécula de unión a DPR que tenga sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, en el cual la presencia de DPRs patológicamente agregadas, de preferencia de C9ORF72-DPRs es indicativo de FTLD y/o ALS, y un incremento del nivel de las DPR patológicamente agregadas, en particular de C9ORF72-DPRs en comparación con el nivel de C9ORF72 fisiológico, es decir, el cual no muestra una traducción de la región de

repetición dentro de proteínas de DPR, es indicativo del avance de FTLD y/o ALS en dicho individuo.

El individuo que va que va a ser diagnosticado puede ser asintomático o preclínico para la enfermedad. De preferencia, el individuo de control tiene una enfermedad asociada con DPR, DPR agregadas y/o de preferencia C9ORF72-DPRs, por ejemplo FTLD, ALS y FTLD-ALS y otras, como se describió anteriormente, en el cual una similitud entre el nivel de las DPR, por ejemplo C9ORF72-DPRs agregadas y el patrón de referencia indica que el individuo que va que va a ser diagnosticado tiene una FTLD, ALS y/o FTLD-ALS o está en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o trastorno asociado con la agregación de DPR. De manera alternativa, o además como segundo control, el individuo de control no tiene una agregación de DPR, en el cual una diferencia entre el nivel de C9ORF72 fisiológico u otra proteína la cual es propensa a tener DPRs insertadas debido a mutación en su gen como el gen C9ORF72 mutada y/o las C9ORF72-DPRs agregadas y el patrón de referencia indica que el individuo que va que va a ser diagnosticado tiene una enfermedad y/o trastorno asociado con DPR, tal como FTLD, ALS y/o FTLD-ALS o está en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o trastorno asociado con las DPR. De preferencia, el individuo que va a ser diagnosticado y el individuo o los

individuos de control tienen la misma edad. La muestra que se va a analizar puede ser cualquier fluido corporal que se sospecha contiene proteínas de DPR de manera patológica tales como C9ORF72-DPR agregadas, por ejemplo sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, fluido peritoneal, saliva o fluido cerebroespinal (CSF).

El nivel de C9ORF72 fisiológica o proteína similar y/o DPR agregadas tales como C9ORF72-DPRs se puede evaluar utilizando cualquier método apropiado conocido en la técnica que comprende, por ejemplo, analizar las DPRs y/o la proteína que incorpora DPRs tal como C9ORF72 mediante una o más técnicas que se eligen a partir de Western blot, inmunoprecipitación, prueba de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel bidimensional, espectrometría de masas (MS), ionización/desorción de láser asistida con matriz-tiempo de vuelo-MS (MALDI-TOF), ionización de desorción de láser incrementada en superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC), cromatografía líquida multidimensional seguida por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y densitometría láser. De preferencia, dicha

formación de imagen *in vivo* de DPRs comprende centelleografía, tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón individual (SPECT), formación de imagen óptica con infrarrojo cercano (NIR) o formación de imagen por resonancia magnética (MRI).

Por lo tanto en una modalidad, se provee un anticuerpo de la presente invención o una molécula de unión a DPR que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, el polinucleótido, el vector o la célula como se definió en la presente solicitud anteriormente o una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende cualquiera de los mismos para usarse en el tratamiento profiláctico, tratamiento terapéutico y/o para monitorear el avance o respuesta al tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la proteína de DPR agregada. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para diagnosticar o monitorear el avance de una enfermedad o trastorno relacionado con proteínas de DPR (tal como FTLD y ALS) en un individuo, el método comprende determinar la presencia de proteínas de DPR en una muestra proveniente del individuo que va a ser diagnosticado con por lo menos un anticuerpo de la presente invención o una molécula de unión a DPR que tiene sustancialmente las mismas especificidades de

unión de cualquiera de los mismos, en el cual la presencia de DPRs tales como C9ORF72 mutada y las especies C9ORF72-DPR agregadas es indicativa respecto a la enfermedad o trastorno. En una modalidad, se provee dicho método para diagnosticar o monitorear el avance de enfermedades y/o trastornos asociados a DPR en un individuo, el método comprende determinar la presencia de DPRs, tal como C9ORF72 mutada y las formas agregadas del mismo en una muestra proveniente del individuo que va a ser diagnosticado con por lo menos un anticuerpo de la presente invención o una molécula de unión a DPR que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, en el cual la presencia de DPR, tal como C9ORF72 mutada y/o C9ORF72-DPRs mutadas es indicativa para enfermedades pre-sintomáticas, prodrómicas o clínicas y/o trastornos asociados con DPR, un incremento del nivel de agregados de DPR, en particular C9ORF72-DPRs en comparación con el nivel de C9ORF72 fisiológico sin DPRs o en comparación con una muestra de referencia obtenida a partir de un individuo de control sano o una muestra de control proveniente del mismo individuo es indicativa respecto al avance de enfermedades pre-sintomáticas, prodrómicas o establecidas y/o trastornos asociados con DPRs tal como FTLD y ALS. Será apreciado por

cualquier experto en la técnica que en una modalidad dicho método se utiliza también para el diagnóstico o para monitorear el avance de cualquier otra enfermedad o trastorno a partir del grupo de trastornos relacionados con DPR y proteínas que contienen DPR, respectivamente, como se definió en la presente solicitud anteriormente.

Tal como se indicó anteriormente, los anticuerpos de la presente invención y las moléculas de la misma especificidad de unión que los anticuerpos se pueden utilizar no solamente *in vitro* sino también *in vivo*, en las cuales además de las aplicaciones diagnósticas, se pueden perseguir aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto en una modalidad, la presente invención también se refiere a una molécula de unión a DPR que comprende por lo menos una CDR de un anticuerpo de la presente invención para la preparación de una composición para la detección de o direccionamiento *in vivo* de un agente terapéutico y/o de diagnóstico para DPR, de preferencia C9ORF72-DPRs en el cuerpo humano o animal. Los agentes terapéuticos y/o de diagnóstico potenciales se pueden elegir entre las enumeraciones no exhaustivas de los agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos asociados con DPR y marcas potenciales como se indicó en la presente solicitud anteriormente en la presente

memoria. Con respecto a la formación de imágenes *in vivo*, en una modalidad preferida la presente invención provee dicha molécula de unión a DPR que comprende por lo menos una CDR de un anticuerpo de la presente invención, en la cual dicha formación de imagen *in vivo* comprende centelleografía, tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón individual (SPECT), formación de imagen óptica con infrarrojo cercano (NIR) o formación de imagen por resonancia magnética (MRI). En una modalidad adicional, la presente invención también provee dicha molécula de unión a DPR que comprende por lo menos una CDR de un anticuerpo de la presente invención, o dicha molécula para la preparación de una composición para los métodos de formación de imágenes *in vivo* especificados anteriormente, para usarse en el método para diagnosticar o monitorear el avance de una enfermedad o trastorno relacionado con proteína de DPR en un individuo, como se definió en la presente solicitud anteriormente.

En este contexto, la presente invención se refiere también a un kit útil en el diagnóstico o monitoreo del avance de enfermedades y/o trastornos asociados con DPR y proteínas que contienen DPR, dicho kit comprende por lo menos un anticuerpo de la presente invención o una molécula de unión a DPR que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de

cualquiera de los mismos, el polinucleótido, el vector o la célula y/o el péptido como se definieron respectivamente en la presente solicitud anteriormente, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

La descripción anterior describe en términos generales la presente invención. A menos que se indique lo contrario, un término tal como se utiliza en la presente solicitud tiene la definición provista en el documento Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revised 2000 and reprinted 2003, ISBN 0 19 850673 2. Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta descripción. Se pueden encontrar las citas bibliográficas completas al final de la descripción que precede inmediatamente a las reivindicaciones. Los contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo referencias de la literatura, patentes emitidas, solicitudes de patente publicadas como se citan a lo largo de esta solicitud incluyendo la sección de antecedentes y las especificaciones, instrucciones del fabricante, etc.) se incorporan en la presente expresamente para referencia; sin embargo, no se hace ninguna admisión respecto a que cualquier documento citado sea sin duda técnica antecedente en cuanto a la presente invención.

Se puede obtener un entendimiento más completo haciendo

referencia a los siguientes ejemplos específicos los cuales se proveen en la presente solicitud solamente para propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Aislamiento e identificación de anticuerpos anti-proteína de repetición de dipéptido (DPR)

Se identifican anticuerpos derivados de humano que eligen como blanco proteínas de repetición de dipéptido (DPR), fragmentos de las mismas, C9ORF72-DPRs y/o fragmentos de los mismos utilizando el método descrito en la solicitud internacional WO 2008/081008 cuyo contenido de la descripción se incorpora en la presente solicitud para referencia, con modificaciones. En particular, las proteínas de repetición de dipéptido son sintetizadas y purificadas por Schafer-N (Copenhague, Dinamarca): GA_{15}: H-CHHHHHH$(GA)_{15}$-OH; GP_{15}: H-C$(GP)_{15}$-OH; GR_{15}: H-C$(GR)_{15}$-OH; $(PA)_{15}$: H-C$(PA)_{15}$-OH; $(PR)_{15}$: H-C$(PR)_{15}$-OH. Las proteínas de repetición de dipéptido después se conjugan mediante un enlazador bifuncional (SMCC)

a seroalbúmina de bovino (BSA). Posteriormente, se efectúa prueba ELISA directa utilizando microplacas de 96 cavidades (Corning) revestidas ya sea con proteínas de repetición de dipéptido no conjugadas o conjugadas con BSA o con BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) a una concentración de 5 µg/ml en solución amortiguadora para revestimiento (15 mM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$, pH 9.42). Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). Se transfiere medio acondicionado para célula B proveniente de placas de cultivo de célula B de memoria a placas para ELISA y se incuban durante una hora a temperatura ambiente, seguido por incubación con un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.) y un anticuerpo específico anti-IgA de humano, de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.). La unión se determina a través de la medición de la actividad de HRP en una prueba colorimétrica estándar. Solamente los cultivos de célula B que muestran la unión de los anticuerpos contenidos en el medio a DPRs pero no a BSA se someten a clonación de anticuerpo.

EJEMPLO 2

Determinación de la secuencia del anticuerpo

Las secuencia de aminoácido de las regiones variables de los anticuerpos anti-DPR identificados anteriormente se determinan tomando como base sus secuencias de ARNm, véase figuras 1A-1J. Brevemente, se recolectan células B vivas a partir de cultivos de célula B de memoria no inmortalizada seleccionados. Posteriormente, los ARNm provenientes de células que producen los anticuerpos anti-DPR seleccionados se extraen y se convierten en ADNc, y las secuencias que codifican para las regiones variables del anticuerpo se amplifican mediante PCR, se clonan dentro de vectores de plásmido y se someten a secuenciación. Brevemente, se utiliza una combinación de iniciadores que representan todas las familias de secuencia del repertorio de línea germinal de inmunoglobulina de humano para las amplificaciones de péptidos líder, segmentos V y segmentos J. La primera ronda de amplificación se efectúa utilizando iniciadores específicos de péptido líder en el extremo 5' e iniciadores específicos de la región constante en el extremo 3' (Smith et al., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384). Para las cadenas pesadas y las cadenas ligeras kappa, la segunda ronda de amplificación se efectúa

utilizando iniciadores específicos de segmento V en el extremo 5' e iniciadores específicos de segmento J en el extremo 3'. Para las cadenas ligeras lambda, la segunda ronda de amplificación se efectúa utilizando iniciadores específicos de segmento V en el extremo 5' y un iniciador específico de región C en el extremo 3' (Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se efectúa volviendo a tamizar en ELISA después de la expresión recombinante de anticuerpos completos. La expresión recombinante de anticuerpos de IgG1 de humano completos se logra después de la inserción de las secuencias de la cadena pesada y ligera variable "en el marco de lectura correcto" dentro de vectores de expresión que complementan la secuencia de la región variable con una secuencia que codifica para un péptido líder en el extremo 5' y en el extremo 3' con una secuencia que codifica para el o los dominios constantes apropiados. Para ese fin los iniciadores contienen sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de las secuencias de la cadena pesada y ligera variable dentro de vectores de expresión de anticuerpo. Las inmunoglobulinas de la cadena pesada se expresan insertando el producto de RT-PCR de la cadena pesada de inmunoglobulina

en el marco dentro de un vector de expresión de la cadena pesada que porta un péptido de señal y los dominios constantes de inmunoglobulina gamma 1 de humano o de ratón. Las inmunoglobulinas de la cadena ligera kappa se expresan insertando el producto de RT-PCR de la cadena ligera kappa en el marco dentro de un vector de expresión de la cadena ligera que provee un péptido de señal y el dominio constante de inmunoglobulina de la cadena ligera kappa de humano. Las inmunoglobulinas de la cadena ligera lambda se expresan insertando el producto de RT-PCR de la cadena ligera lambda en el marco dentro de un vector de expresión de la cadena ligera lambda que provee un péptido de señal y el dominio constante de inmunoglobulina de la cadena ligera lambda de humano o de ratón.

Se obtienen anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales después de la co-transfección en células HEK 293 o CHO (o cualquier otra línea celular receptora apropiada de origen humano o de ratón) de un vector de expresión de la cadena pesada de Ig y un vector de expresión de la cadena ligera de Ig kappa o lambda. El anticuerpo monoclonal recombinante de humano posteriormente se purifica a partir del medio acondicionado utilizando una purificación en columna con Proteína A estándar. El anticuerpo monoclonal recombinante de

humano se puede producir en cantidades ilimitadas utilizando células transfectadas ya sea de manera transitoria o estable. Las líneas celulares que producen anticuerpo monoclonal recombinante de humano se pueden establecer ya sea utilizando los vectores de expresión de Ig directamente o volviendo a clonar las regiones variables de Ig dentro de vectores de expresión diferentes. También se pueden generar derivados tales como F(ab), F(ab)2 y scFv a partir de dichas regiones variables de Ig.

La estructura base y las regiones determinantes de complementariedad se determinan mediante comparación con secuencias de anticuerpo de referencia disponibles en bases de datos tales como Abysis (http://www.bioinf.org.uk/abysis/), y con anotaciones utilizando el esquema de numeración de Kabat (http://www.bioinf.org.uk/abs/).

EJEMPLO 3

Análisis de la CE_{50} mediante ELISA para proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72

Para determinar la especificidad de unión y la mitad de la concentración efectiva máxima (CE_{50}) de los anticuerpos de C9orf72 recombinantes derivados de humano NI-308.15O7, NI-

308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8,NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10 para proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 se efectúa un análisis de la CE_{50} mediante ELISA. Brevemente, las proteínas de repetición de dipéptido son sintetizadas y purificadas por Schafer-N (Copenhague, Dinamarca): $(GA)_{15}$: H-CHHHHHH$(GA)_{15}$-OH; $(GP)_{15}$: H-C$(GP)_{15}$-OH; $(GR)_{15}$: H-C$(GR)_{15}$-OH; $(PA)_{15}$: H-C$(PA)_{15}$-OH; $(PR)_{15}$: H-C$(PR)_{15}$-OH. Se revisten microplacas de 96 cavidades (Corning Incorporated, Corning, EE.UU) con péptidos de proteína de repetición de dipéptido a una concentración ya sea de 5 µg/ml o 20 µg/ml en solución amortiguadora para revestimiento (15 mM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$, pH 9.42). Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). Los anticuerpos primarios se diluyen hasta las concentraciones indicadas y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por incubación con un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.). La unión se determina a través de la medición de la actividad de HRP en una prueba colorimétrica estándar. Los valores de CE_{50} se estiman mediante regresión no

linear utilizando el *software* GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.). La especificidad de unión y la CE_{50} de anticuerpos derivados de humano para las péptidos de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72 $(GA)_{15}$, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ y $(PR)_{15}$ se determinan mediante ELISA indirecta. Los anticuerpos NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2 y NI-308.18F7 reconocen exclusivamente la proteína de DPR poli-GA con afinidades de unión en el intervalo subnanomolar o nanomolar bajo (figuras 2A-2E). El anticuerpo NI-308.24E11 se une específicamente a la proteína de DPR poli-PR con una CE_{50} nanomolar baja (figuras 2A y 2F) mientras que el anticuerpo NI-308.16C10 reconoce de manera preferencial la proteína de DPR poli-PR con una CE_{50} nanomolar baja y también se une con una afinidad más baja a la proteína de DPR poli-GA (figuras 2A y 2M). Los anticuerpos NI-308.5G2, NI-308.12A3 y NI-308.46E9 reconocen de manera preferencial la proteína de DPR poli-GP con CE_{50} subnanomolar y nanomolar baja, respectivamente y también se une con afinidades más bajas a DPR poli-GA (figuras 2A, 2G, 2L y 2H). El anticuerpo NI-308.6B11 muestra unión a múltiples proteínas de DPR, eligiendo como blanco a poli-GR, poli-GA y poli-PR, con la afinidad más alta para proteína de DPR poli-GR (figuras 2A y 2I). Se observa un patrón de unión similar para NI-308.46F8 aunque a una afinidad más baja

(figuras 2A y 2J). El anticuerpo NI-308.4M1 reconoce de manera preferencial la proteína de DPR poli-PA con CE_{50} subnanomolar y también se une con una afinidad más baja a la proteína de DPR poli-GA (figuras 2A y 2K). En conclusión, los análisis del repertorio inmune de alto rendimiento de poblaciones de donadores humanos de edad avanzada sanos mediante tamizado con RTM™ conduce a la clonación exitosa y a la producción recombinante de anticuerpos monoclonales de humano que eligen como blanco DPRs asociadas con expansión de hexanucleótido de C9orf72 con alta afinidad. Los anticuerpos recombinantes de humano son selectivos ya sea para una DPR individual o eligen como blanco múltiples especies - debido potencialmente a un aminoácido compartido común en las repeticiones.

EJEMPLO 4

Afinidad de unión a péptidos de DPR copulados a BSA

Para determinar la especificidad de unión y la mitad de la concentración efectiva máxima (CE_{50}) de los anticuerpos de C9orf72 recombinantes derivados de humano NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1,

NI-308.12A3 y NI-308.16C10 para proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 copuladas a seroalbúmina de bovino (BSA) se efectúa un análisis de la CE_{50} mediante ELISA. Brevemente, las proteínas de repetición de dipéptido son sintetizadas y purificadas por Schafer-N (Copenhague, Dinamarca): $(GA)_{15}$: H-CHHHHHH$(GA)_{15}$-OH; $(GP)_{15}$: H-C$(GP)_{15}$-OH; $(GR)_{15}$: H-C$(GR)_{15}$-OH; $(PA)_{15}$: H-C$(PA)_{15}$-OH; $(PR)_{15}$: H-C$(PR)_{15}$-OH. Los péptidos de proteína de DPR después se conjugan mediante un enlazador bifuncional (SMCC) a seroalbúmina de bovino (BSA). Se revisten microplacas de 96 cavidades (Corning Incorporated, Corning, EE.UU.) con péptidos de proteína de repetición de dipéptido copulados a BSA o no copulados a una concentración ya sea de 5 µg/ml or 20 µg/ml en solución amortiguadora para revestimiento (15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9.42). Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). Los anticuerpos primarios se diluyen hasta las concentraciones indicadas y se incuban 1 hora a temperatura ambiente, seguido por incubación con un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.). La unión se determina a través de la medición de la actividad de HRP en una prueba

colorimétrica estándar. Los valores de CE_{50} se estiman mediante regresión no linear utilizando el *software* GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.). Se determinan las afinidades de unión comparables para DPRs copuladas a BSA y no copulados para los anticuerpos NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.4M1 y NI-308.12A3 (figuras 3A-3D, 3G, 3H, 3K, 3L). Los anticuerpos NI-308.45C2, NI-308.24E11 y NI-308.16C10 muestran una afinidad reducida para los péptidos de DPR copulados a BSA respectivos (figuras 3A, 3E, 3F y 3M) mientras que los anticuerpos NI-308.6B11 y NI-308.46F8 no se unen a DPRs copuladas a BSA bajo estas condiciones experimentales (figuras 3A, 3I y 3J). En conclusión, la mayoría de los anticuerpos de DPR de humano pueden reconocer péptidos de DPR copulados a la proteína vehículoa de BSA con afinidades comparables con péptidos revestidos de manera hidrofóbica. Las afinidades de unión más bajas observadas para candidatos individuales podría deberse a una pobre eficiencia de copulación de péptidos de DPR individuales a BSA, a una diferente conformación después de copulación a BSA o una inaccesibilidad estérica del epítope después de copulación química dirigida a sitio al vehículo.

EJEMPLO 5

Análisis de la especificidad de unión a proteínas amiloidogénicas no relacionadas

Para determinar la especificidad de objetivo de los anticuerpos recombinantes NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 y NI-308.46F8 se efectúa ELISA indirecta de la siguiente manera. Se revisten microplacas de 96 cavidades (Corning) con diferentes proteínas objetivo a una concentración de 1-10 µg/ml en solución amortiguadora para revestimiento (15 mM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$, pH 9.42). Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). Los anticuerpos NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 y NI-308.46F8 se diluyen a una concentración de 20 nM y se incuban 1 hora a temperatura ambiente. La unión se determina utilizando anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.) seguido por la medición de la actividad de HRP en una prueba colorimétrica estándar. Las señales para la proteína objetivo se calculan en incremento en número de veces por encima de la mediana. La determinación de

la especificidad de objetivo de los anticuerpos derivados de humano NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 y NI-308.46F8 mediante ELISA indirecta evalúa la unión de anticuerpo a proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 y seis proteínas formadoras de amiloide no relacionadas (PHFTau, Tau, TDP-43, TTR, fIAPP and HTT). Como se muestra en las figuras 4A-4I los anticuerpos derivados de humano NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.6B11 y NI-308.46F8 revelan su especificidad de unión alta a péptidos de DPR con reactividad cruzada ausente o mínima a proteínas amiloidogénicas no relacionadas para la mayoría de los candidatos (figuras 4A-4F, 4H y 4I). Para el anticuerpo NI-308.46E9 se detecta una señal fuera de objetivo elevada para varios analitos (figura 4G).

EJEMPLO 6

Análisis Western blot de proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72

Para determinar la especificidad de unión de los anticuerpos de C9orf72 recombinantes derivados de humano NI-

308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 y NI-308.16C10 para proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 se efectúa análisis inmunoblot. Los péptidos de proteína de repetición de dipéptido son sintetizados y purificados por Schafer-N (Copenhague, Dinamarca): $(GA)_{15}$: H-CHHHHHH$(GA)_{15}$-OH; $(GP)_{15}$: H-C$(GP)_{15}$-OH; $(GR)_{15}$: H-C$(GR)_{15}$-OH; $(PA)_{15}$: H-C$(PA)_{15}$-OH; $(PR)_{15}$: H-C$(PR)_{15}$-OH. Los péptidos de proteína de DPR después se conjugan mediante un enlazador bifuncional (SMCC) a seroalbúmina de bovino (BSA). Brevemente, los péptidos de proteína de repetición de dipéptido conjugados con BSA (0.5 µg) se resuelven mediante SDS-PAGE en gradiente (Novex® Bis-Tris NuPAGE® 4-12%; Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza) utilizando solución amortiguadora para corrida Novex® NuPAGE® MES SDS complementada con antioxidante (Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza). Las proteínas resueltas después se someten a electroblotting (Novex® Semi-Dry Blotter, 1 hora, 25V) en membranas de PVDF activadas con metanol (Membranas para transferencia Immobilon®-P, Merck & Cie, Schaffhausen, Suiza) mediante el uso de solución amortiguadora para transferencia Novex® NuPAGE® 2x (Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza). Los sitios de unión no específicos se

bloquean durante toda la noche a 4°C (o de manera alternativa durante 1 hora a temperatura ambiente) con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) (PBST). Los anticuerpos NI-308 se diluyen ya sea a una concentración de 10 nM o 100 nM y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente (o de manera alternativa durante toda la noche a 4°C). Las membranas se lavan tres veces en PBST durante 15 min a temperatura ambiente y después se incuban con un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP (dilución 1:20000 ó 1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión de anticuerpo se determina mediante desarrollo de membrana utilizando ECL y detección con ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza).

La especificidad de unión de los anticuerpos derivados de humano a proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 copuladas a BSA $(GA)_{15}$, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ y $(PR)_{15}$ se determina mediante análisis Western blot. Los anticuerpos NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.28G1 y NI-308.45C2 reconocen exclusivamente la proteína de DPR poli-GA (figuras 5A-5D). Los anticuerpos NI-308.24E11 y NI.308-16C10 se unen específicamente a la proteína de DPR individual poli-PR (figuras

5E y 5J), con el anticuerpo NI-308.16C10 reconociendo adicionalmente DPR poli-GA (figura 5J). Los anticuerpos NI-308.5G2, NI.308-12A3 y NI-308.46E9 eligen como blanco específicamente a poli-GP (figuras 5F, 5G y 5I), con el anticuerpo NI-308.5G2 reconociendo adicionalmente DPR poli-GA (figura 5F). El anticuerpo NI-308.4M1 reconoce exclusivamente la proteína de DPR poli-PA (figura 5H). Para los anticuerpos NI-308.6B11 y NI-308.46F8 no se detecta ninguna unión a DPRs copuladas a BSA mediante análisis Western blot bajo las condiciones experimentales seleccionadas (datos no mostrados). En conclusión, la mayoría de los anticuerpos de DPR de C9orf72 derivados de humano pueden reconocer péptidos de DPR copulados a BSA después de análisis SDS PAGE y Western blot. Los patrones de unión observados son consistentes con los resultados obtenidos mediante análisis ELISA.

EJEMPLO 7

Análisis de unión en solución a DPRs de C9orf72 mediante inmunoprecipitación

Para evaluar la unión en solución de los anticuerpos de DPR de C9orf72 recombinantes derivados de humano NI-

308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11y NI-308.6B11 mediante inmunoprecipitación. Brevemente, las proteínas de repetición de dipéptido son sintetizadas y purificadas por Schafer-N (Copenhagen, Dinamarca): $(GA)_{15}$: H-CHHHHHH$(GA)_{15}$-OH; $(GP)_{15}$: H-C$(GP)_{15}$-OH; $(GR)_{15}$: H-C$(GR)_{15}$-OH; $(PA)_{15}$: H-C$(PA)_{15}$-OH; $(PR)_{15}$: H-C$(PR)_{15}$-OH. Se diluyen cinco microgramos de péptidos de proteína de repetición de dipéptido no copulados a BSA en 500 µl de PBS, pH 7.4 (Gibco®, Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza) hasta una concentración final de 10 µg/ml. Las muestras de péptidos de proteína de DPR se pre-adsorben con 25 µl de proteína A Dynabeads® (Novex®; Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza) mediante incubación a 4°C durante 30 min en una plataforma giratoria. Se agregan 1 ó 10 µg de los anticuerpos seleccionados a las muestras pre-adsorbidas y se incuban durante toda la noche a 4°C en una plataforma giratoria. Se capturan complejos inmunes mediante la adición de 25 µl de proteína A-Dynabeads e incubación a 4°C durante 2 horas en una plataforma giratoria. Los glóbulos se lavan de conformidad con las instrucciones del fabricante, se suspenden en solución amortiguadora para muestra y se calientan a 95°C durante 3 minutos. Para el análisis Western Blot, los complejos inmunes y los péptidos de proteína de DPR no copulados (500

ng) se resuelven mediante SDS-PAGE (Novex® Bis-Tris NuPAGE® 12%; Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza) utilizando solución amortiguadora para corrida Novex® NuPAGE® MES SDS (Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza) bajo condiciones no reductoras. Las proteínas resueltas se someten a electroblotting (Novex® Semi-Dry Blotter, 1 hora, 25V) en membranas de PVDF activadas con metanol (Membrana para transferencia Immobilon®-P, Merck & Cie, Schaffhausen, Suiza) en solución amortiguadora para transferencia Novex® NuPAGE® (Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza). Los sitios de unión no específicos se bloquean durante toda la noche a 4°C con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma- Aldrich, Buchs, Suiza) (PBST). Las proteínas de DPR se revelan mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos de detección: $(GA)_{15}$: NI-308.28G1, 10 nM; $(PR)_{15}$: NI-308.24E11, 100 nM; $(GR)_{15}$: clon anti-C9ORF72/C9RANT 5A5, dilución 1:5000 (MABN778, Merck & Cie, Schaffhausen, Suiza). Las membranas se lavan tres veces en PBST durante 15 min a temperatura ambiente y se incuban ya sea con un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP (dilución 1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.) o un anticuerpo anti-kappa de rata,

de ratón conjugado con HRP (dilución 1:10000, SouthernBiotech, Birmingham, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se desarrollan utilizando ECL y detección con ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza). Los anticuerpos NI-308.15O7, NI-308.18F7, NI-308.45C2 y NI-308.28G1 capturan los péptidos de proteína de DPR poli-GA en solución (figura 6A) mientras que los anticuerpos NI-308.24E11 y NI-308.6B11 precipitan poli-PR y poli-GR, respectivamente (figuras 6B y 6C). El anticuerpo de control de isotipo NI-43A11 sí precipita cualquiera de los péptidos de proteína de DPR analizados (figuras 6A-6C). En conclusión, los anticuerpos de DPR de C9orf72 derivados de humano se pueden unir a y precipitar péptidos de proteína de DPR en solución.

EJEMPLO 8

Caracterización de la unión dependiente de la longitud de la repetición mediante ELISA indirecta

Para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos recombinantes derivados de humano NI-308.15O7, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, y NI-302.4M1 a DPRs de C9orf72 de

diferentes tamaños de repetición se efectúa un análisis de la CE_{50} mediante ELISA. Brevemente, las proteínas de repetición de dipéptido son sintetizadas y purificadas por Schafer-N (Copenhagen, Dinamarca): GA_{20}: H-$(GA)_{20}$HHHHHH-NH_2; GA_{10}: H-$(GA)_{10}$HHHHHH-NH_2; GA_6: H-$(GA)_6$HHHHHH-NH_2; GA_5: H-$(GA)_5$HHHHHH-NH_2; GA_4: H-$(GA)_4$HHHHHH-NH_2; GA_3: H-$(GA)_3$HHHHHH-NH_2; GA_2: H-$(GA)_2$HHHHHH-NH_2; GP_{20}: H-$(GP)_{20}$HHHHHH-NH_2; GP_{10}: H-$(GP)_{10}$HHHHHH-NH_2; GP_6: H-$(GP)_6$HHHHHH-NH_2; GP_5: H-$(GP)_5$HHHHHH-NH_2; GP_4: H-$(GP)_4$HHHHHH-NH_2; GP_3: H-$(GP)_3$HHHHHH-NH_2; GP_2: H-$(GP)_2$HHHHHH-NH_2. GR_{20}: H-$(GR)_{20}$HHHHHH-NH_2; GR_{10}: H-$(GR)_{10}$HHHHHH-NH_2; GR_6: H-$(GR)_6$HHHHHH-NH_2; GR_5: H-$(GR)_5$HHHHHH-NH_2; GR_4: H-$(GR)_4$HHHHHH-NH_2; GR_3: H-$(GR)_3$HHHHHH-NH_2; GR_2: H-$(GR)_2$HHHHHH-NH_2; PA_{20}: H-$(PA)_{20}$HHHHHH-NH_2; PA_{10}: H-$(PA)_{10}$HHHHHH-NH_2; PA_6: H-$(PA)_6$HHHHHH-NH_2; PA_5: H-$(PA)_5$HHHHHH-NH_2; PA_4: H-$(PA)_4$HHHHHH-NH_2; PA_3: H-$(PA)_3$HHHHHH-NH_2; PA_2: H-$(PA)_2$HHHHHH-NH_2; PR_{20}: H-$(PR)_{20}$HHHHHH-NH_2; PR_{10}: H-$(PR)_{10}$HHHHHH-NH_2; PR_6: H-$(PR)_6$HHHHHH-NH_2; PR_5: H-$(PR)_5$HHHHHH-NH_2; PR_4: H-$(PR)_4$HHHHHH-NH_2; PR_3: H-$(PR)_3$HHHHHH-NH_2; PR_2: H-$(PR)_2$HHHHHH-NH_2. Se revisten microplacas de 96 cavidades (Corning Incorporated, Corning, EE.UU.) con péptidos de proteína de repetición de dipéptido a

una concentración de 50 µg/ml en solución amortiguadora para revestimiento (15 mM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$, pH 9.42). Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). Los anticuerpos primarios se diluyen hasta las concentraciones indicadas y se incuban 1 hora a temperatura ambiente, seguido por incubación con un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.). La unión se determina a través de la medición de la actividad de HRP en una prueba colorimétrica estándar. Los valores de CE_{50} se estiman mediante regresión no linear utilizando el *software* GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.).

La afinidad de unión de los anticuerpos NI-308 seleccionados para proteínas de DPR de C9orf72 con longitudes de repetición diferentes se determina después de revestimiento con péptido hidrofóbico mediante ELISA indirecta. Los anticuerpos NI-308.15O7 y NI-308.28G1 requieren un mínimo de 5 repeticiones de dipéptido GA mientras que los anticuerpos NI-308.18F7 y NI-308.45C2 requieren por lo menos 6 repeticiones de GA para una primera unión de afinidad baja detectable a una CE_{50} > 100 nM (figuras 7A, 7F-7I). La unión de afinidad alta se

detecta para las DPRs poli-GA que albergan 10 ó 20 repeticiones de (GA), reflejada en una CE_{50} en el intervalo subnanomolar o nanomolar bajo (figuras 7A, 7C-7I). Los anticuerpos NI-308.5G2 y NI-308.46E9 requieren un mínimo de 5 y 10 repeticiones de GP, respectivamente (figuras 7B, 7J y 7N). La unión de afinidad alta para éstos últimos 2 anticuerpos se detecta solamente en longitudes de repetición expandida para péptidos de proteína de DPR poli-GP que albergan 10 y 20 repeticiones. Además, el anticuerpo NI-308.5G2 requiere un mínimo de 6 repeticiones de dipéptido GA para una primera unión de afinidad baja detectable a una CE_{50} >100 nM (figuras 7A y 7K). La unión de afinidad alta se detecta para las DPRs poli-GA que albergan 10 ó 20 repeticiones de (GA), reflejada en una CE_{50} en el intervalo nanomolar bajo (figuras 7A y 7K). El anticuerpo NI-308.6B11 requiere un mínimo de 3 repeticiones de GR (figuras 7C y 7L). La unión de afinidad alta para este anticuerpo se detecta para péptidos de proteína de DPR poli-GR que albergan por lo menos 5 repeticiones de dipéptido GR (figuras 7C y 7L). Además, el anticuerpo NI-308.6B11 requiere un mínimo de 6 repeticiones de dipéptido GA para una primera unión de afinidad baja detectable a una CE_{50} >100 nM (figura 7A y 7M). La unión de afinidad alta se detecta para los DPRs poli-GA que albergan 10 ó 20 repeticiones de (GA), reflejada en una

CE_{50} en el intervalo nanomolar bajo (figuras 7A y 7M). El anticuerpo NI-308.24E11 requiere un mínimo de 6 repeticiones de dipéptido PR (figuras 7D y 7O) mientras que el anticuerpo NI-308.4M1 requiere por lo menos 5 repeticiones de PA (figuras 7E y 7P) para una primera unión de afinidad baja detectable a una CE_{50} >100 nM o a una afinidad de unión nanomolar de dos dígitos, respectivamente. La unión de afinidad alta para éstos últimos 2 anticuerpos se detecta solamente para longitudes de repetición expandida para las DPRs poli-PR y poli-PA que albergan 10 ó 20 repeticiones, respectivamente, reflejada en una CE_{50} en el intervalo nanomolar bajo o subnanomolar (figuras 7D, 7E, 7O y 7P). En conclusión, los anticuerpos de DPR de C9orf72 derivados de humano muestran una unión dependiente de la longitud de la repetición a DPRs con unión ausente a tamaños de repetición cortos y unión de afinidad alta preferencial a repeticiones de dipéptido extendidas.

EJEMPLO 9

Caracterización de la unión dependiente de la longitud de la repetición mediante ELISA de emparedado

Para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos recombinantes derivados de humano NI-308.15O7, NI-308.28G1,

NI-308.18F7 y NI-308.5G2 para proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 de diferentes tamaños de repetición. Brevemente, los péptidos de proteína de repetición de dipéptido marcados con His son sintetizados y purificados por Schafer-N (Copenhague, Dinamarca): GA_{20}: H-$(GA)_{20}$HHHHHH-NH_2; GA_{10}: H-$(GA)_{10}$HHHHHH-NH_2; GA_6: H-$(GA)_6$HHHHHH-NH_2; GA_5: H-$(GA)_5$HHHHHH-NH_2; GA_4: H-$(GA)_4$HHHHHH-NH_2; GA_3: H-$(GA)_3$HHHHHH-NH_2; GA_2: H-$(GA)_2$HHHHHH-NH_2; GP_{20}: H-$(GP)_{20}$HHHHHH-NH_2; GP_{10}: H-$(GP)_{10}$HHHHHH-NH_2; GP_6: H-$(GP)_6$HHHHHH-NH_2; GP_5: H-$(GP)_5$HHHHHH-NH_2; GP_4: H-$(GP)_4$HHHHHH-NH_2; GP_3: H-$(GP)_3$HHHHHH-NH_2; GP_2: H-$(GP)_2$HHHHHH-NH_2. Se revisten microplacas de 96 cavidades (Corning Incorporated, Corning, EE.UU.) con anticuerpo anti-marca de His monoclonal de ratón (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia) a una concentración de 10 µg/ml en solución amortiguadora para revestimiento (15 mM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$, pH 9.42) durante toda la noche a 4°C. Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). después de un paso de lavado, se agregan péptidos de proteína de DPR de C9orf72 marcados con His a concentración igual ya sea de 1 µM o 5 µM en PBS (pH 7.4) para captura de objetivo mediante el

anticuerpo anti-marca de His durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un paso de lavado adicional, los anticuerpos NI-308 se diluyen en PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) hasta las concentraciones indicadas y se incuban 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos que se unen a péptidos de proteína de DPR son detectados mediante un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP a una dilución de 1:5000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión se determina a través de la medición de la actividad de HRP en una prueba colorimétrica estándar. Los valores de CE_{50} se estiman mediante regresión no linear utilizando el *software* GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.). La afinidad de unión de los anticuerpos NI-308 seleccionados para proteínas de DPR de C9orf72 con longitudes de repetición diferentes se determina después de captura de la marca His de las proteínas de DPR mediante ELISA de emparedado. Los anticuerpos NI-308.1507, NI-308.18F7, NI-308.28G1 requieren un mínimo de 10 repeticiones de GA para la unión en solución a los péptidos de proteína de DPR poli-GA (figuras 8A, 8C-8E). Las afinidades de unión para los anticuerpos NI-308.18F7 y NI-308.28G1 están en el intervalo subnanomolar y son equivalentes tanto para los

péptidos de proteína de DPR $(GA)_{10}$ como $(GA)_{20}$ (figuras 8A, 8D y 8E). El anticuerpo NI-308.15O7 muestra una unión de afinidad alta solamente para el péptido de la proteína de DPR $(GA)_{20}$ expandido (figuras 8A y 8C). El anticuerpo NI-308.5G2 muestra una dependencia de unión similar en longitudes de repetición de DPR poli-GP expandidas con una unión significativa iniciando solamente a las 20 repeticiones de GP (figuras 8B y 8F). En conclusión, los anticuerpos de DPR de C9orf72 derivados de humano muestran una unión dependiente de la longitud de repetición pronunciada para DPRs con unión ausente para repeticiones cortas y unión de afinidad alta preferencial a repeticiones de dipéptido extendidas. La selectividad observada para DPRs expandidas es incluso más pronunciada después de captura de antígeno en comparación con péptidos revestidos de manera hidrofóbica (Ejemplo 9).

EJEMPLO 10

Análisis de la unión a DPR de C9orf72 monoméricas y agregadas

Para determinar la especificidad de unión y la mitad de la

concentración efectiva máxima (CE_{50}) de los anticuerpos NI-308.18F7 y NI-308.15O7 recombinantes derivados de humano a proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 GA monoméricas y agregadas.

Métodos

Péptido de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72

La proteína de repetición de dipéptido $(GA)_{20}$ (H-$(GA)_{20}$HHHHHH-NH_2) es sintetizada y purificada por Schafer-N (Copenhague, Dinamarca). Se disuelve el péptido liofilizado a una concentración de 10 mg/ml en DMSO (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza).

Generación de preparaciones monoméricas y fibrilares agregadas de péptido de proteína de DPR $(GA)_{20}$

Para obtener una preparación de proteína de DPR monomérica, se disuelven péptidos $(GA)_{20}$ a una concentración de 200 µg/ml en solución de amortiguador de carbonato (15 mM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$, pH 9.42) y se congelan inmediatamente a -80°C. Para obtener agregados de DPR, se disuelven péptidos $(GA)_{20}$ a una concentración de 200 µg/ml en solución amortiguadora de acetato de sodio (50 mM de $C_2H_3O_2Na$, 100 mM de KCl y 1 mM de EDTA, pH 3.0) y se

incuban durante 72 horas a temperatura ambiente con agitación (600 rpm). Las preparaciones de péptido se almacenan a -80°C hasta que se utilizan.

Microscopía de transmisión de electrones

Las muestras se adsorben sobre rejillas de cobre revestidas con carbono con descarga luminosa. El exceso de la muestra se retira secando con papel filtro. Las rejillas se tiñen con 2% (p/v) de acetato de uranilo durante 1 min y el exceso de acetato de uranilo se lava con agua desionizada destilada. Las rejillas se secan al aire y se obtienen imágenes utilizando un microscopio de transmisión de electrones Philips CM100 con un voltaje de aceleración de 100 kV.

ELISA indirecta

Se revisten microplacas de 96 cavidades (Corning Incorporated, Corning, EE.UU.) con preparaciones de péptido de proteína de DPR $(GA)_{20}$ monomérico y agregado a una concentración de 5 µg/ml en solución amortiguadora para revestimiento (15 mM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$, pH 9.42). Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). Los anticuerpos

primarios se diluyen hasta las concentraciones indicadas y se incuban 1 hora a temperatura ambiente, seguido por incubación con un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.). La unión se determina a través de la medición de la actividad de HRP en una prueba colorimétrica estándar. Los valores de CE_{50} se estiman mediante regresión no linear utilizando el *software* GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.).

ELISA en emparedado

Se revisten microplacas de 96 cavidades (Corning Incorporated, Corning, EE.UU.) con anticuerpo anti-marca de His monoclonal de ratón (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia) a una concentración de 10 µg/ml en solución amortiguadora para revestimiento (15 mM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$, pH 9.42) durante toda la noche a 4°C. Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). Después de un paso de lavado, se agregan preparaciones de péptido de proteína de DPR (GA)20 marcado con His a concentraciones iguales de 5 µM en PBS (pH 7.4) para captura de objetivo mediante el anticuerpo

anti-marca de His durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un paso de lavado adicional, los anticuerpos NI-308 se diluyen en PBS/Tween®-20 al 0.1% que contiene BSA al 2% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) hasta las concentraciones indicadas y se incuban 1 hora a temperatura ambiente. La unión del anticuerpo a los péptidos de proteína de DPR se detecta mediante un anticuerpo específico de Fcγ anti-IgG de humano, de asno conjugado con HRP a una dilución de 1:5000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión se determina a través de la medición de la actividad de HRP en una prueba colorimétrica estándar. Los valores de CE_{50} se estiman mediante regresión no linear utilizando el *software* GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.).

Como resultado las proteínas de repetición de dipéptido $(GA)_{20}$ de C9orf72 se agregan fácilmente en estructuras que re-ensamblan fibrillas de amiloide después de envejecimiento bajo condiciones ácidas, como se revela mediante análisis de microscopía de transmisión de electrones (figura 10B). En contraste, bajo condiciones básicas el péptido de proteína de DPR $(GA)_{20}$ no forma agregados fibrilares y probablemente permanece en un estado monomérico (figura 10A). La especificidad de unión y la afinidad de unión (CE_{50}) de los

anticuerpos derivados de humano NI-308.18F7 y NI-308.15O7 para las preparaciones de péptido de proteína de DPR $(GA)_{20}$ de C9orf72 monomérico o agregado se determinan mediante pruebas de unión ELISA indirecta y en emparedado. Ambos anticuerpos reconocen con afinidades de unión comparables las preparaciones de péptido de proteína $(GA)_{20}$-DPR monomérico así como también agregado (figuras 9, 11A-11B y 12A-12B). Se reporta que la proteína de repetición de dipéptido poli-GA es la especie peptídica más prevalente en C9orf72-FTLD (Mori *et al.*, Acta Neuropathol. 2013). Las proteínas de repetición de dipéptido $(GA)_{20}$ se agregan fácilmente en estructuras fibrilares tipo amiloide después de envejecimiento bajo condiciones ácidas pero no básicas. Los anticuerpos NI-308.18F7 y NI-308.15O7 derivados de humano reconocen con afinidades de unión comparables las preparaciones de $(GA)_{20}$-DPR monomérica así como también agregada en dos pruebas de unión independientes. Dichos anticuerpos, por lo tanto, son candidatos apropiados para elegir como blanco proteínas de DPR GA patológicas en una conformación soluble así como también no soluble.

EJEMPLO 11

Análisis de la integridad del anticuerpo mediante SDS PAGE

Para evaluar la pureza e integridad de los anticuerpos NI-308 recombinantes de humano. Brevemente, se expresan anticuerpos NI-308 de humano mediante transfecciones transitorias de células CHO-S y se purifican mediante purificación por afinidad con proteína A en un sistema FPLC (ÄKTApurifier; GE Healthcare Life Sciences). Después de desalinización en columna PD-10 (GE Healthcare Life Sciences), los anticuerpos se formulan en PBS. Se resuelven cinco µg de anticuerpos NI-308 recombinantes de humano purificados bajo condiciones reductoras mediante SDS-PAGE en gradiente (Novex® Bis-Tris NuPAGE® 4-12%; Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza) utilizando solución amortiguadora para corrida Novex® NuPAGE® MES SDS complementada con antioxidante (Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza) seguido por tinción con azul de Coomassie (Novex® SimplyBlueTM SafeStain, Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza). Como resultado, el análisis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de los anticuerpos NI-308 recombinantes de humano revela dos bandas principales que corresponden a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo del tamaño esperado. No es detectable ninguna contaminación significativa o productos degradación proteolítica (figura 13).

EJEMPLO 12

Análisis de la unión a patología por agregados de DPR en tejidos cerebrales C9orf72-FTLD post mortem y de control no neurológicos de humano

Para evaluar la unión de los anticuerpos NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 y NI-308.4M1 a proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 en tejidos del cerebelo post-mortem obtenidos a partir de pacientes humanos con C9orf72-FTLD y controles no neurológicos. Brevemente, se pre-tratan secciones de 5 µm incrustadas en parafina, fijadas con formalina de cerebelo proveniente de 3 pacientes con FTLD con expansiones de repetición de hexanucleótido de C9orf72 y de 1 individuo de control no neurológico (BiOBANC HCB-IDIBAPS, Barcelona, España) para recuperación de antígeno cocinando en solución amortiguadora de EDTA 1 mM, pH 8.3, e irradiación con microondas durante 12 min (600 W). La extinción de la actividad de peroxidasa endógena se logra mediante tratamiento con H_2O_2 al 3% en metanol durante 10 min a temperatura ambiente. Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/suero al 5% (caballo/cabra)/BSA al 4%. Después del paso de bloqueo, las secciones se incuban

con los anticuerpos NI-308.18F7, NI-308.15O7,NI-308.5G2 y NI-308.4M1 derivados de humano a una concentración de 5 nM o con anticuerpo de control C9RANT a una dilución de 1:5000 (Novus Biologicals, Littleton, EE.UU.) durante toda la noche a 4°C. La detección se efectúa con anticuerpo anti-IgG (H+L) de humano, de asno biotinilado (dilución 1:350, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, EE.UU.) o anticuerpo secundario anti-conejo (dilución 1:250, Vector Laboratories; Burlingame, EE.UU.) y la señal del anticuerpo se amplifica con el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.) y se detecta con diaminobencidina (DAB, Thermo Scientific, Rockford, EE.UU.). Los portaobjetos se montan utilizando el medio para montaje Eukitt® (O. Kindler GmbH; Freiburg, Alemania). La formación de imágenes de campo brillante se efectúa utilizando un escáner de portaobjetos Dotslide VS120 (Olympus Schweiz AG, Suiza). La unión de NI-308.18F7, NI-308.15O7, NI-308.5G2 y NI-308.4M1 a proteínas de repetición de dipéptido de C9orf72 patológicas se evalúa mediante el análisis inmunohistoquímico de las secciones de cerebelo provenientes de pacientes con FTLD y un individuo de control no neurológico. Como se muestra en las figuras 14A y 14B, los anticuerpos NI-308.18F7, NI- 308.15O7 y NI-308.5G2 derivados de humano revelan inclusiones citoplasmáticas

neuronales, inclusiones intranucleares neuronales y neuritas distróficas prominentes en la capa de células granulares del cerebelo de los tres casos con C9orf72-FTLD analizados. En contraste, el cerebelo de control no neurológico resultó negativo para todos los anticuerpos analizados (figura 14A). Como se muestra en la figura 14C, el anticuerpo NI-308.4M1 revela inclusiones citoplasmáticas neuronales e inclusiones intranucleares neuronales en la capa de células granulares del cerebelo de un caso con C9orf72-FTLD pero no de un caso de control no neurológico. En conclusión, los anticuerpos derivados de humano NI-308.18F7, NI-308.15O7,NI-308.5G2 y NI-308.4M1 detectan específicamente agregados de proteína de repetición de dipéptido de C9orf72 en la capa de células granulares del cerebelo de los casos con C9orf72-FTLD mientras que no se observa ninguna tinción en el cerebelo de control lo que demuestra la alta especificidad de objetivo de los anticuerpos.

EJEMPLO 13

Unión del anticuerpo humano a especies de DPR co-agregadas en FTLD

Para evaluar la localización de distintas especies de proteínas de DPR de C9orf72 en tejidos de cerebelo post-

mortem provenientes de pacientes humanos con FTLD que portan expansiones de repetición de hexanucleótido de C9orf72. Brevemente, el anticuerpo NI-308.18F7 se conjuga directamente al colorante de fluorescencia Atto 488 mediante el uso del kit para marca con proteína Atto 488 (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) de conformidad con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo NI-308.5G2 se conjuga directamente a Atto 550 mediante el uso del kit para marca con proteína Atto 550 (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Para los experimentos de histoquímica por inmunofluorescencia, se pre-tratan secciones de 5 µm incrustadas en parafina, fijadas con formalina del cerebelo proveniente de un paciente con FTLD con expansiones de repetición de hexanucleótido de C9orf72 (BiOBANC HCB-IDIBAPS, Barcelona, España) para recuperación de antígeno cocinando en solución amortiguadora de EDTA 1 mM, pH 8.3, e irradiación con microondas durante 12 min (600 W). Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS/suero al 5% (caballo/cabra)/BSA al 4%. Después del paso de bloqueo, las secciones se incuban con los anticuerpos de humano NI-308.18F7-Atto 488 y NI-308.5G2-Atto 550 a 5 nM durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la inmunotinción, las secciones de tejido

se incuban con una solución de Negro de Sudán B al 0.1% durante 10 min a temperatura ambiente para disminuir la autofluorescencia del tejido. Se efectúa contratinción nuclear mediante el uso de tinción de ácido nucleico DAPI (dilución 1:1000 de una solución de reserva 5 mg/ml, Molecular Probes®, Life Technologies Europe B.V., Zug, Suiza). Los portaobjetos se montan utilizando el medio Hydromount (National Diagnostics, Atlanta, EE.UU.). La formación de imágenes por fluorescencia se efectúa utilizando un escáner de portaobjetos Dotslide VS120 (Olympus Schweiz AG, Suiza).

La localización de las proteínas de DPR poli-GA y poli-GP de C9orf72 en la capa granular del cerebelo de un paciente humano con FTLD que porta expansiones de repetición de hexanucleótido de C9orf72 se evalúan mediante microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la figura 15, el anticuerpo NI-308.18F7 reconoce inclusiones de poli-GA de C9orf72 citoplasmáticas e intranucleares neuronales ampliamente extendidas (panel izquierdo, señal de tinción verde). Bajo las condiciones experimentales elegidas NI-308.5G2 detecta una patología más esparcida de inclusiones de poli-GP citoplasmáticas e intranucleares (panel central, señal de tinción roja). Una fracción sustancial de agregados de proteína de DPR poli-GP se co-localizan con agregados de proteína de DPR poli-

GA (panel izquierdo, señal de tinción amarilla) lo que sugiere que ambas proteínas de DPR se pueden co-agregar en inclusiones patológicas.

EJEMPLO 14

Modelos basados en célula para estudiar los mecanismos patogénicos de proteínas de DPR de C9orf72

Reportes recientes de cultivo celular emergente y en modelos animales proveen evidencia para la toxicidad de proteínas de DPR de C9orf72 aberrantes. Por ejemplo, en modelos en moscas y algunos cultivos celulares, se descubrió que particularmente las proteínas de DPR ricas en arginina (poli-GR y poli-PR) son tóxicas (Kwon *et al.*, Science 345 (2014), 1139-1145; Mizielinska *et al.*, Science 345 (2014), 1192-1194; Tao *et al.*, Hum. Mol. Genet. 24 (2015), 2426-2441; Wen *et al.*, Neuron 84 (2014), 1213-1225; Yang *et al.*, Acta Neuropathol. 130 (2015), 525-535) al inducir inclusiones nucleares y estrés nucleolar, mientras que otros reportan toxicidad para agregados de poli-GA citoplasmáticos en sistemas de cultivo celular (May *et al.*, Acta Neuropathol. 128 (2014), 485-503; Zhang *et al.*, Acta Neuropathol. 128 (2014), 505-524).

Para determinar si, como se demuestra para tau (Yanamandra *et al.*, Ann. Clin. Transl. Neurol. 2 (2013), 278-288) y α-sinucleína (Tran *et al.*, Cell Rep. 7 (2014), 2054-2065), la propagación de la patología de DPR se puede evitar mediante tratamiento con anticuerpos de la presente invención, se utilizan pruebas de toxicidad de DPR de C9orf72 *in vitro* de tipo similar. En particular, se generan secuencias de ADN sintético para impulsar la expresión de proteínas de DPR individuales que albergan 150 repeticiones de dipéptido en una traducción dependiente de ATG. Se utiliza una estrategia de codón aleatorizado para asegurar la expresión de solamente la secuencia de proteína de DPR individual seleccionada. Para impulsar la expresión de las proteínas de DPR en células neuronales tales como SH-SY5Y, NSC-34, Neuro-2a, neuronas derivadas de iPSC y neuronas primarias, se clonan las secuencias de ADN sintético dentro de un vector de expresión regulado por el promotor Thy 1.2 específico de neurona. Para la expresión de alto nivel en una amplia gama de células eucariotas tales como células HEK293T, U-2 OS, HeLa y Cos las secuencias de ADN sintético se clonan dentro de vectores de expresión regulados por el promotor de CMV. Las neuronas derivadas de iPSC de humano y las neuronas trans-diferenciadas (iNeuronas) obtenidas a partir de fibroblastos de

pacientes con C9orf72 representan modelos de cultivo celular de proteínas de DPR de C9orf72.

Dichos modelos celulares se pueden utilizar para analizar la utilidad terapéutica de los anticuerpos de la presente invención. La evaluación y confirmación de los efectos terapéuticos de los anticuerpos de la presente invención se puede evaluar monitoreando la viabilidad celular mediante pruebas de actividad mitocondrial y/o de caspasa, toxicidad celular mediante pruebas de citolisis y/o fuga de membrana, e inhibición de la propagación de proteínas de DPR en células mediante pruebas inmunohistoquímicas.

EJEMPLO 15

Modelos de ratón transgénico para estudiar los mecanismos patogénicos de las proteínas de C9orf72DPR

Las estrategias de inmunoterapia desarrolladas contra proteínas propensas a la agregación y/o mal plegadas han producido resultados prometedores en los estudios preclínicos y clínicos de diversas enfermedades neurodegenerativas. Recientemente se han desarrollado modelos de ratón transgénico que recapitulan características patológicas de ALS/FTLD mediadas por expansión de repetición de

hexanucleótido de C9orf72 ((Chew *et al.*, Science 348 (2015), 1151-1154); y solicitud internacional WO2014/159247 A1). Para la generación de dichos modelos de ratón, se utilizan construcciones de cromosoma artificial bacteriano que albergan ya sea un gen C9orf72 expandido de repetición de hexanucleótido de longitud completa o truncado (entre ~450 a 500 repeticiones de hexanucleótido) o un vector viral adeno-asociado que alberga una secuencia de 66 repeticiones de hexanucleótido de C9orf72. En dichos modelos de ratón, se ha detectado la acumulación de focos de ARN nuclear y de proteínas de DPR mediadas por expansión de repetición de hexanucleótido de C9orf72 en el sistema nervioso central. Además, se han observado los signos patológicos de la enfermedad de C9orf72 tales como pérdida neuronal, anormalidades en el comportamiento, déficits motores y supervivencia disminuida en los diferentes modelos de ratón transgénico. Dichos modelos de ratón se pueden utilizar para analizar la utilidad terapéutica de los anticuerpos de la presente invención. En particular, los anticuerpos que se van a tamizar se pueden aplicar en diversas vías posibles a los animales tales como inyección de anticuerpo intraperitoneal, inyección intracraneal, infusión cerebral intraventricular y analizar respecto a efectos del tratamiento.

Debido a la optimización evolutiva y la maduración por afinidad dentro del sistema inmune humano los anticuerpos de la presente invención proveen una herramienta terapéutica valiosa debido a que se aíslan a partir de individuos humanos sanos con alta probabilidad para un excelente perfil de seguridad y falta de inmunogenicidad. La confirmación de dichos efectos terapéuticos esperados puede ser provista por los métodos de prueba como se describen en las publicaciones mencionadas anteriormente con anticuerpos de humano en lugar de anticuerpos de ratón.